

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné a vývojové biologie



**Struktura a vlastnosti mutanty hPrp31 v
Retinitis pigmentosa**

**Structure and characteristics of mutant
hPrp31 in Retinitis pigmentosa**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. David Staněk, Ph.D.

Oddělení biologie RNA, ÚMG AV ČR, v. v .i.

PRAHA 2010

Petr Těšina

Prohlášení

Diplomová práce byla vypracována v letech 2008 – 2010 na Ústavu molekulární genetiky, AV ČR, v.v.i., na Oddělení biologie RNA a v Laboratoři strukturní biologie.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením mého školitele, Mgr. Davida Staňka, Ph.D.

Petr Těšina

Poděkování

Chtěl bych poděkovat kolegům z oddělení biologie RNA, zejména vedoucímu práce, Davidu Staňkovi, za jeho skvělý přátelský přístup a veškerou praktickou i teoretickou pomoc při vedení práce. Zuzce Cvačkové, Matě Huranové a Evě Duškové děkuji za jejich ochotu a pomoc. Našemu bývalému kolegovi, Braňu Fleischerovi, patří můj dík za to, že mi dal šanci a vzal si mě coby naprosto nezkušeného a nervózního žadatele na starost.

Celému kolektivu laboratoře strukturní biologie děkuji za přátelské přijetí. Velice speciální poděkování patří Pavlu Maderovi, který mi byl v novém prostředí jakýmsi náhradním školitelem a spolu s Irenou Sieglou mi postupně představoval biochemické metody používané v laboratoři strukturní biologie a práci s nezbytným softwarem. Milanu Fábrymu, Pavlíně Řezáčové a Petru Pachlovi děkuji za cenné rady a ochotu.

Jaroslavu Kalivodovi z oddělení biologických kontrol Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. děkuji za pomoc při přípravě protilátky a péči o králíka Frantu.

Obsah

ABSTRAKT	6
KLÍČOVÁ SLOVA	6
ABSTRACT.....	7
KEYWORDS.....	7
ÚVOD A CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
RETINITIS PIGMENTOSA	10
Definice a popis.....	10
Symptomy a diagnostika	11
Primární retinitis pigmentosa	11
Diagnostika	13
Sekundární retinitis pigmentosa	14
Genetika retinitis pigmentosa	15
Formy dědičnosti	15
Geny v retinitis pigmentosa	16
Buněčné procesy ovlivněné retinitis pigmentosa	17
Léčba	18
PRE-MRNA SESTŘÍH	19
Sestřihový cyklus	21
Tvorba a recyklace snRNP	23
PRE-MRNA SESTŘÍH A RETINITIS PIGMENTOSA.....	25
Sestřihové faktory v adRP	27
RP9	27
PRPF3	28
PRPF8	29
SNRNP200.....	30
PRPF31	30
MATERIÁL A METODY.....	35
MATERIÁL	35
Přístroje	35
Bakteriální kmeny a buněčné linie	36
Plazmidy a primery	37
Chemikálie	38
Protilátky a enzymy.....	39
Pufry.....	40
METODY	42
Příprava expresního vektoru.....	42
Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	42
Purifikace produktu PCR	42

TOPO klonovací reakce	43
Preparace plazmidové DNA v malém měřítku	44
Restrikční analýza	44
Expres a zpracování rekombinantních proteinů	45
Transformace kompetentních buněk	45
Kultivace bakteriální kultury a exprese rekombinantního proteinu	45
Zpracování biomasy	46
Zpracování vyčištěných inkluzních tělísek	46
Štěpení TEV proteázou	47
Chromatografické metody	47
Chelatační chromatografie	47
Ionexová chromatografie	48
Gelová permeační chromatografie	48
Elektromigrační metody	49
SDS-PAGE	49
Western blot (WB)	49
Horizontální agarózová elektroforéza	50
Ostatní metody	50
Příprava lyzátu HeLa buněk	50
Dialýza	51
Ultrafiltrace	51
Barvení SDS-PAGE gelů stříbrem	51
Spektrofotometrická měření	51
Fluorescenční mikroskopie	52
Dynamic light scattering (DLS)	53
Imunizace	53
VÝSLEDKY	54
EXPRES AD29 HPRP31 (78-333)	54
Příprava expresního vektoru	54
Podmínky a výsledky exprese	56
Renaturace	59
Purifikace a štěpení TEV proteázou	61
PŘÍPRAVA POLYKLONÁLNÍ KRÁLIČÍ PROTILÁTKY AHPRP31	64
CHARAKTERIZACE REKOMBINANTNÍHO PRODUKTU	66
Homologní modelování	70
EXPRES WILD-TYPE HPRP31 (78-333)	72
DISKUSE	74
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
SEZNAM ZKRATEK	89
EVIDENCE VYPŮJČOVATELŮ	91

Abstrakt

Retinitis pigmentosa je dědičné onemocnění, které způsobuje postupné odumírání světločivných buněk a pigmentového epitelu sítnice oka v degenerativním procesu, který představuje jednu z nejčastějších příčin poškození zraku a slepoty. Jde o geneticky velice heterogenní nemoc. Geny, jejichž mutace ji způsobují, jsou většinou exprimovány pouze v buňkách fotoreceptorů. Výjimkou jsou čtyři geny kódující sestřihové faktory účastnící se pre-mRNA sestřihu, které jsou nezbytné pro přežití všech transkripčně aktivních buněk lidského těla. Je proto překvapivé, že mutantní formy těchto proteinů způsobují onemocnění postihující specificky fotoreceptory.

Jedním z těchto sestřihových faktorů je i hPrp31, jehož mutantní forma označovaná jako AD29 je hlavním předmětem této práce. Některé účinky této mutace na buněčné úrovni byly nedávno publikovány. V této práci je prezentována tvorba expresního vektoru, exprese a purifikace úseku AD29 mutantní formy proteinu hPrp31. Purifikovaný produkt byl použit k produkci polyklonální králičí protilátky, jejíž použití pro imunofluorescenční značení a western blot bylo úspěšně testováno. Dále je ukázáno objevení nového účinku AD29 mutace, který je zřejmě zodpovědný za některé její negativní projevy na buněčné úrovni, a srovnání struktur úseků 78-333 wild-type a AD29 forem pomocí homologního modelování.

Klíčová slova

retinitis pigmentosa, retinopatie, pre-mRNA sestřih, hPrp31, PRPF31, 61K, Prp31, AD29, RP11, U4/U6 snRNP

Abstract

Retinitis pigmentosa is a hereditary eye disease causing progressive loss of photoreceptor cells, which leads to an irreversible sight handicap and eventually complete blindness. It is a major cause of visual handicap or blindness with very heterogenous genetic background. There are four genes accounting for retinitis pigmentosa that encode splicing factors necessary for spliceosomal assembly and function. Unlike any of the other known genes associated with this disease, these are all expressed ubiquitously throughout the human body. Intriguingly, the mutant forms of these vital splicing factors cause cell-type specific disease affecting only photoreceptor cones and rods. Molecular mechanisms underlying this cell-type specific effect remain elusive.

One of these splicing factors is the hPrp31 protein. Its mutant form known as AD29 is the focal point of this thesis. Some of the effects of this mutation on the cellular level have been discovered recently. A creation of the expression vector followed by expression and purification of the truncated hPrp31 protein carrying the AD29 mutation is presented in this thesis. The purified product has been used for production of a α hPrp31 polyclonal rabbit antibody, whose applicability to western blot and immunofluorescence staining has been verified. Moreover a novel effect of the mutation that is probably implied in its negative impact has been discovered. Finally the 78-333 fragments of wild-type and AD29 forms' structures were compared using homology modelling.

Keywords

retinitis pigmentosa, retinopathy, pre-mRNA splicing, hPrp31, PRPF31, 61K, Prp31, AD29, RP11, U4/U6 snRNP

Úvod a cíle práce

Retinitis pigmentosa je dědičné onemocnění, které způsobuje postupné odumírání světločivných buněk a pigmentového epitelu sítnice oka. Tento degenerativní proces představuje jednu z nejčastějších příčin poškození zraku a slepoty. Jde o geneticky velice heterogenní nemoc s 37 dosud identifikovanými geny, jejichž mutace jsou dohromady zodpovědné za zhruba polovinu případů. Značná část pacientů navíc trpí ještě přidruženými syndromy, které postihují další tkáně a mají vlastní genetické příčiny. Jakkoliv je již řada genů zodpovědných za vznik tohoto onemocnění široká, mají společný expresní profil omezený na buňky fotoreceptorů. Výjimku z tohoto pravidla tvoří čtyři geny kódující sestříhové faktory, naprosto nezbytné součásti spliceosomálního komplexu zajišťujícího pre-mRNA sestřih. Bez těchto proteinů se žádná transkripčně aktivní buňka lidského těla neobejde. Je tedy překvapivé, že se mutace těchto genů projevují specificky pouze v sítnici. Příčiny tohoto jevu zůstávají navzdory snaze o funkční charakterizaci jednotlivých mutací neznámé.

Jedním z těchto genů je PRPF31, kódující sestříhový faktor hPrp31. Mutace tohoto genu označovaná jako AD29 a její vliv na funkci proteinu hPrp31 je studována na Oddělení biologie RNA, ÚMG AV ČR, v.v.i. Zde se podařilo odhalit některé zásadní účinky této mutace na buněčné úrovni *in vivo*, nikoliv však vysvětlit tkáňovou specifitu jejich projevů pouze v buňkách fotoreceptorů. Pochopení vzniku těchto specifických symptomů je nezbytným předpokladem pro případnou budoucí léčbu.

Určitým limitujícím faktorem pro studium tohoto proteinu se ukázala nefunkčnost komerční protilátky dodávané firmou Abcam, kterou bylo možné nahradit jen díky laskavosti Dr. Rivolty. Důležitým cílem této práce proto bylo vytvoření vlastní polyklonální protilátky, použitelné pokud možno i pro imunofluorescenční značení, které hrálo zásadní roli v odhalení některých účinků AD29 mutace. Nezbytným předpokladem k tomu bylo vytvoření expresního vektoru, optimalizace exprese a purifikace rekombinantního proteinu. Jelikož byla známa struktura fragmentu wild-type formy proteinu hPrp31 v rozsahu aminokyselinových zbytků 78-333, bylo rozhodnuto použít pro přípravu protilátky stejný úsek a po provedení purifikace provést jeho strukturní analýzu rentgenovou krystalografií ve spolupráci s Laboratoří strukturní biologie, ÚMG AV ČR, v.v.i. Srovnání struktur wild-type a mutantní formy by mohlo

být klíčovým krokem k pochopení mechanismů účinků této mutace a vzniku nemoci retinitis pigmentosa.

Cíle této práce v jednotlivých bodech tedy jsou:

- Shrnutí současného stavu poznání role sestřihových faktorů v retinitis pigmentosa a jejich přirozené buněčné role v pre-mRNA sestřihu, se zvláštním zaměřením na protein hPrp31.
- Vytvoření expresního vektoru, optimalizace rekombinantní exprese a purifikace úseku 78-333 AD29 mutantní formy proteinu hPrp31.
- Produkce polyklonální králičí protilátky proti proteinu hPrp31, pokud možno využitelné i pro imunofluorescenční značení.
- Biochemická a strukturní analýza úseku 78-333 AD29 mutantní formy proteinu hPrp31 ve srovnání s wild-type formou.

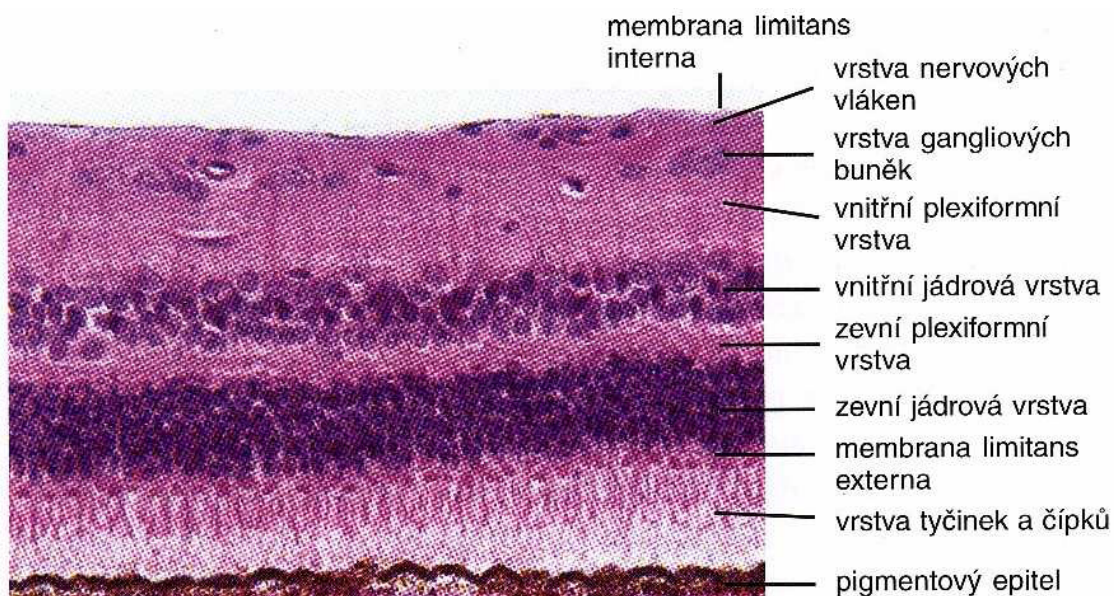
Teoretický úvod

Retinitis pigmentosa

Definice a popis

Retinitis pigmentosa (RP) je označení celé skupiny dědičných onemocnění, která mohou vést až k oslepnutí, v důsledku degenerace a postupného odumírání světločivných buněk sítnice – tyčinek a čípků. Název retinitis, tedy retinitida, je v tomto případě zavádějící, protože nejde o primárně zánětlivé, ale degenerativní onemocnění [1]. Retinitis pigmentosa je nejčastější příčinou poškození zraku nebo slepoty, způsobující 25% případů těchto postižení.

Čípky jsou fotoreceptory zprostředkující centrální ostrý zrakový vjem a barevné vidění. V sítnici jsou zejména lokalizovány v oblasti žluté skvrny (*macula lutea*), respektive v její centrální části (*fovea centralis*). Směrem k okraji sítnice pak jejich hustota klesá. Tyčinky zprostředkovávají periferní a noční (skotopické) vidění jsou naopak nejhustěji zastoupeny na okraji sítnice.



Obrázek 1: Mikrofotografie vrstev sítnice. Převzato z: P. Petrovický a kol., Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi, III. sv., 2002

Mimo tyčinek a čípků postihuje RP také nejspodnější vrstvu sítnice – pigmentový epitel (*pars pigmentosa retinae*, RPE – retinal pigmented epithelium), který slouží k pohlcování světla prošlého vrstvami sítnice, čímž zabraňuje jeho zpětnému odrazu a rozostření vidění. Mimo to také zajišťuje výživu světločivných buněk a odstraňuje odloučené části jejich vnějších segmentů.

Retinitis pigmentosa není příliš rozšířeným onemocněním, postihuje přibližně jednoho ze čtyř tisíc lidí v oblasti Evropy a Spojených států amerických [2, 3], což by znamenalo zhruba 1,5 milionu postižených na celém světě. Jde ale jen o odhad, neboť z ostatních částí světa není k dispozici dostatek údajů a také se stále objevují další geny, jejichž mutace vede k tomuto onemocnění.

Symptomy a diagnostika

Ačkoliv je retinitis pigmentosa velmi různorodé onemocnění, u většiny případů se dají vysledovat určité typické projevy, které následují po sobě v charakteristické sekvenci. Primárně dochází k degeneraci tyčinek a až později bývají postiženy také čípky. V atypických případech tomu může být i naopak a tyčinky podléhají degeneraci až poté, co se postižení projeví u čípků. Symptomy RP se obvykle naplno projevují po dlouhé době a jejich postupné zhoršování je relativně pomalé, přesto jsou případy kdy je nástup i průběh onemocnění rychlý (např. u zvláštní formy RP - Leberovy kongenitální amaurozy).

Pokud toto onemocnění postihuje pouze tkáň sítnice (resp. výše popsané typy buněk), jedná se o tzv. primární (nebo také izolovanou) retinitis pigmentosa.

Primární retinitis pigmentosa

Primární RP můžeme rozdělit do tří fází.

Časná fáze je charakterizována postupným odumíráním tyčinek, což vede k šerosleposti (nyktalopii). V této fázi ještě pacienti nepociťují žádná zásadní omezení v každodenním životě, ačkoliv při chabém osvětlení se již může projevit počínající omezení zorného pole. I pokud pacient vyhledá vyšetření u očního lékaře, je v této fázi stanovení diagnózy RP velice nepravděpodobné.

Oční pozadí při oftalmoskopickém vyšetření vypadá ještě zcela normálně, nemoc zatím neovlivňuje ostrost vidění ani vnímání barev.

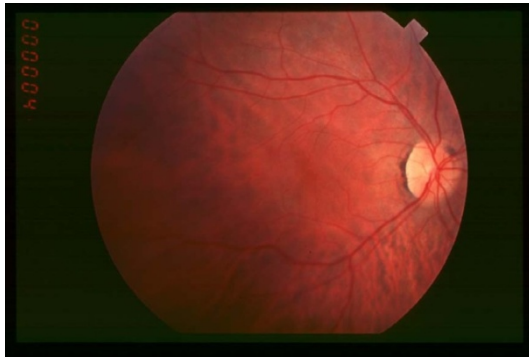
V pokročilé fázi se již symptomy jasně projevují v každodenním životě pacientů a mohou je v některých situacích i ohrozit na životě (například při řízení za špatných světelných podmínkách). Periferní zorné pole se ztrácí i při jasném osvětlení, šeroslepost se v důsledku pokračujícího odumírání tyčinek dále zhoršuje.

V průběhu této fáze se také objevují další příznaky jako světloplachost (fotofobie, nepříjemná až bolestivá reakce na silnější světlo) a neschopnost rozlišit tmavé odstíny barev. Pacient tedy není schopen normálního vidění při slabém ani při silném osvětlení.

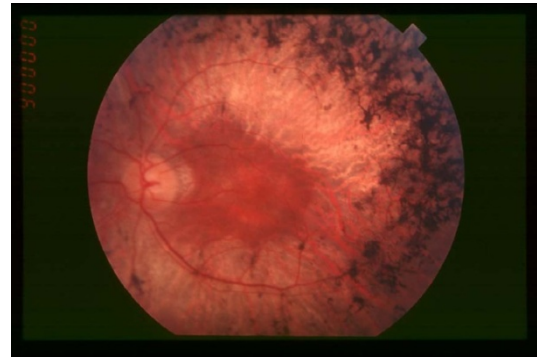
Jak pokračuje odumírání světločivných buněk, začínají být postiženy také buňky RPE. Doprovodným jevem je atenuace retinálních arteriol. Poškozené buňky RPE uvolňují pigment melanin, který formuje typické perivaskulární agregáty jehlicovitého tvaru (viz Obrázek 2). Tyto degenerativní změny již jsou při oftalmoskopickém vyšetření očního pozadí jasně patrné.

Při konečné fázi je zorné pole dramaticky zúžené až na několik málo úhlových stupňů poloměru okolo bodu fixace pohledu. Tento symptom se označuje jako tzv. tunelové vidění. Další zhoršování tohoto symptomu vede až ke kompletní ztrátě zorného pole, kdy je postižený člověk schopen vnímat už jen světlo nebo tmu, a posléze k úplnému oslepnutí.

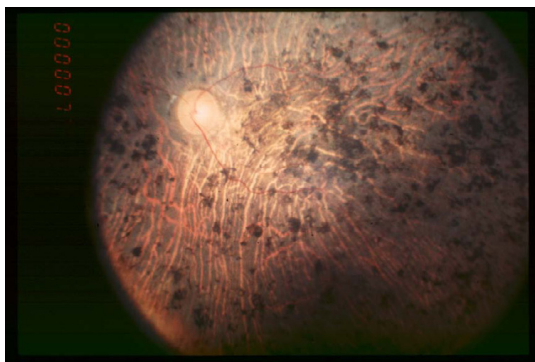
Novým projevem onemocnění pozorovatelným při oftalmoskopickém vyšetření je v této fázi bledost terče zřetelného nervu (*papilla nervi optici*).



A



B



C

Obrázek 2: Obraz vyšetření očního pozadí pacienta s RP, (A) – časná fáze, (B) – pokročilá fáze, (C) – konečná fáze

Výše popsané symptomy, zejména zvětšování oblasti postižené ukládáním melaninových agregátů, jsou dobře patrné. Převzato z: Hamel et al., 2006

Diagnostika

Lékařská konference v roce 1983 stanovila tři symptomy, které musí nezbytně pacient vykazovat pro stanovení diagnózy RP [4].

Tyto symptomy jsou:

- dysfunkce tyčinek (měřená testem adaptace na tmu nebo elektroretinografií – ERG)

- postupující ztráta funkce světločivných buněk

- omezení zorného pole (resp. ztráta periferního vidění)

Výše popsané typické degenerativní změny sítnice jako tvorba jehlicovitých pigmentových útvarů, atenuace cév sítnice, degenerativní změny RPE a zblednutí zračového nervu nejsou tedy pro diagnostikování RP nutné, ale slouží k jejímu odlišení od jiných onemocnění oka.

Nejspolehlivějším a nejobektivnějším testem pro stanovení diagnózy RP a také vyhodnocení její závažnosti a stádia je elektroretinografie (ERG). Tato metoda využívá měření elektrických odpovědí sítnice na podráždění světlem, které jsou zaznamenávány pomocí kontaktní elektrody.

Ani ERG však neodhalí postižení RP v počáteční fázi, kdy jsou ještě degenerativní změny sítnice malé. V pozdějších fázích je již elektroretinogram jasně abnormální, se slábnoucí nebo dokonce neměřitelnou elektrickou odpovědí.

Vyšetření periferního zorného pole typicky odhaluje oblasti rozostření nebo ztráty vidění (skotomy).

Sekundární retinitis pigmentosa

Pokud se postižení retinitis pigmentosa projevuje i jinde než v tkáních oka, jedná se o tzv. sekundární RP. Je známo více než 30 syndromů sekundární RP, které postihují 20-30% pacientů [5].

Nejčastější z nich je Usherův syndrom, který způsobuje sluchové problémy nebo dokonce úplnou hluchotu. Tento syndrom postihuje 10-20% všech pacientů s RP [6].

Častý je také Bardetův-Biedlův syndrom (zvaný také Laurenceův-Moonův-Bardetův-Biedlův syndrom) projevující se mentální retardací, polydaktylií (zmnožením prstů horních nebo dolních končetin), hypogonadismem, obezitou a vzácně také anomáliemi vnitřních orgánů (zejm. ledvin). Bardetův-Biedlův syndrom se projevuje u 5-6% případů RP [5].

Příkladem méně častého syndromu sekundární RP je Cohenův syndrom (zvaný také Červenkův podle Jaroslava Červenky [7]) způsobený mutací v genu COH1. Tento gen kóduje protein účastnící se vezikulárního transportu proteinů [8].

Většina syndromů sekundární RP vykazuje autozomálně recesivní dědičnost.

Genetika retinitis pigmentosa

Formy dědičnosti

Retinitis pigmentosa je velice geneticky různorodé onemocnění. Zatímco mutace v různých genech mohou vykazovat stejný způsob dědičnosti, různé mutace ve stejném genu mohou vést k odlišným formám dědičnosti [9, 10]. Příkladem jsou mutace genu RHO, které mohou vést buď k autozomálně recesivní RP (arRP), nebo autozomálně dominantní RP (adRP).

Primární RP může být dědičná formou autozomálně dominantní, autozomálně recesivní, X vázanou a vzácně také digenní.

Způsob dědičnosti	Podíl na všech případech RP
autozomálně dominantní	15-25%
autozomálně recesivní	5-20%
X vázaný	5-15%
neznámý	40-50%
digenní	velice vzácný

Tabulka 1: Podíl jednotlivých forem dědičnosti na všech případech RP. Převzato z: Fishman et al., 1978

Pod neznámou formu dědičnosti spadají všechny případy vzniklé *de novo*, tedy bez předchozího výskytu v rodině, případy neodhalené autozomálně recesivní dědičnosti nebo případy, kdy pacienti z nějakého důvodu neposkytnou informace o rodinné anamnéze.

Digenní RP je velice vzácná, protože aby se projevila, musí mít pacient současně dvě různé mutantní formy genů, z nichž jedna (L185P v proteinu kódovaném genem PRPH2) je přítomna ve všech doposud popsáných případech. Druhá mutace je v genu ROM1, zde už je však více možností [11].

U žen s xRP se obvykle nemoc projevuje daleko mírněji než u mužů, nebo se dokonce neprojevuje vůbec.

Geny v retinitis pigmentosa

Doposud bylo identifikováno 37 genů, jejichž mutace způsobují onemocnění primární RP (viz Tabulka 2). Jen letos (2010) byly identifikovány dva z nich [12, 13]. Celý tento soubor genů a jejich jednotlivých mutant však dohromady představuje původce asi jen poloviny všech případů RP, takže mnohé další ještě čekají na objevení [14].

Přestože je možné v jednotlivých genech vysledovat určité typické mutace, které se u pacientů vyskytují často, u většiny těchto genů bylo nalezeno mnoho různých, vzácně se vyskytujících mutací, které jsou zodpovědné za onemocnění RP.

způsob dědičnosti	zmapovaný lokus (neidentifikovaný)	zmapované a identifikované geny
autozomálně dominantní	žádný	CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, SEMA4A, SNRNP200, TOPORS
autozomálně recesivní	RP22, RP25, RP28, RP29, RP32	ABCA4, C2ORF71, CDHR1, CERKL, CNGA1, CNGB1, CRB1, EYS, IDH3B, LRAT, MERTK, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PRCD, PROM1, RBP3, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RPE65, SAG, SPATA7, TULP1, USH2A
X vázaný	RP6, RP23, RP24, RP34	RP2, RPGR

Tabulka 2: Geny v RP seřazené podle forem dědičnosti. Převzato z: RetNet

Detaily k jednotlivým genům a lokusům jsou dostupné online na Entrez Gene nebo GeneCards.

Pokud jsou stejné geny uvedeny u různých způsobů dědičnosti, jde o různé mutace.

Až na tři významné výjimky není žádný soubor mutantních forem jednotlivého genu příčinou výraznějšího podílu případů RP. Těmito výjimkami jsou: gen RHO, který kóduje rodopsin a jehož mutace jsou příčinou až 25% případů adRP, gen USH2A

(Usher syndrome 2A), který kóduje protein asociovaný s membránou, pravděpodobně s důležitou rolí ve vývoji a udržování homeostáze vnitřního ucha a sítnice, jehož mutace jsou příčinou zhruba 20% případů arRP, a konečně gen RPRG kódující RP GTPázový regulátor zodpovědný za asi 30% případů xRP. Mutanty těchto tří genů jsou dohromady zodpovědné za přibližně 30% všech případů RP [5].

Buněčné procesy ovlivněné retinitis pigmentosa

Nejčastěji se mutace způsobující RP objevují v genech kódujících proteiny, které se účastní fototransdukce (přeměna energie dopadajících fotonů v tyčinkách a čípcích na nervové impulsy). Jde o geny: RHO (rhodopsin), PDE6A a PDE6B (α a β podjednotky fosfodiesterázy cyklického guanosinmonofosfátu), CNGA1 (cyclic nucleotide gated channel) a SAG (arrestin).

Další skupina genů kóduje proteiny s rolí v recyklaci 11-cis-retinaldehydu (chromofor absorbující energii fotonu, což vede k jeho fotoizomerizaci na začátku fototransdukční kaskády). V této skupině jsou geny: ABCR (ATP-binding cassette transporter of rods), RPE65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa), CralbR (cellular retinaldehyde binding protein), RGR (RPE G-protein coupled receptor).

Některé mutace způsobující onemocnění RP najdeme také v genech kódujících regulátory exprese na transkripční i posttranskripční úrovni. Jde například o geny NLR (neural retina leucine zipper), a CRX (cone-rod homebox). Tyto proteiny jsou exprimovány specificky pouze ve fotoreceptorech.

To platí také pro geny kódující strukturní proteiny jako například: PRPH2 (peripherin 2), ROM1 (retinal outer segment membrane protein 1), FSCN2 (retinal fascin), ROM1 (retinal outer segment membrane protein 1) a PROM1 (prominin 1).

Naopak u genů kódujících pre-mRNA sestřihové se faktory je situace zajímavá právě tím, že jejich proteinové produkty (jde o pět dosud identifikovaných sestřihových faktorů, jejichž mutanty způsobují adRP) jsou exprimovány ve všech tkáních lidského těla. Jelikož jeden z těchto genů kóduje protein hPrp31, hlavní objekt zájmu této práce, budou otázky propojení sestřihu a onemocnění RP, i další podrobnosti popsány níže v samostatné kapitole Pre-mRNA sestřih a retinitis pigmentosa.

Pokud vynecháme sekundární RP, nelze už u ostatních dosud identifikovaných genů nalézt další skupinu, která by se skrze svoje produkty účastnila jednoho buněčného procesu.

Léčba

Doposud není známa žádná účinná terapie, která by umožňovala léčbu pacientů s RP. Bylo provedeno mnoho studií posuzujících účinky doplňků stravy na pacienty s RP. Některé práce ukazují zpomalení průběhu nemoci při podávání vitamínu A nebo luteinu [15, 16], avšak tyto výsledky jsou stále zpochybňovány a nelze je tedy považovat za definitivně prokázané [17].

Testují se ale i nové přístupy, které by mohly vést k nalezení léčby. Například léčba pomocí kmenových buněk, která by využívala autologního dárce, čímž by se dalo vyhnout použití kontroverzních embryonálních kmenových buněk. Jako vhodné pro autologní dárce se jeví nervové progenitorové buňky limbálního epitelu nebo buněk izolovaných z kostní dřeně [18, 19].

Také genová terapie představuje možnost jak využít znalosti o genetických příčinách RP pro léčbu. Tento přístup je však limitován stále nevyřešenými otázkami jeho dlouhodobé bezpečnosti pro pacienty a také velkou různorodostí v genetických příčinách RP. Z tohoto důvodu by bylo výhodnější použít jako léčiva neuroprotektivní látky, které by účinkovaly na celou škálu možných mutací způsobujících RP a zpomalovaly průběh onemocnění. Jako nadějný se v tomto směru jeví například ciliární neurotrofický faktor (CNTF) [20] nebo nilvadipin [21] (blokátor vápníkového kanálu používaný jako antihypertenzivum).

Nadějí může pro pacienty s RP být i technický pokrok na poli vývoje elektronické protézy sítnice, která by mohla vrátit zrak oslepnuvším pacientům [22].

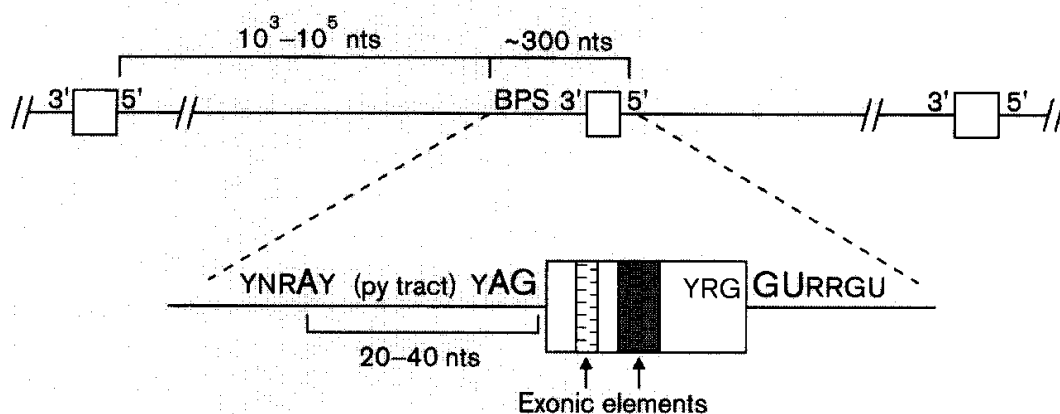
Pre-mRNA sestřih

Prekurzorová mRNA (pre-mRNA, precursor messenger ribonucleic acid) je transkribována polymerázou II v jádře a podstupuje sérii kotranskripčních a posttranskripčních úprav. Jako první je na 5' konec nascentního (asi 30 nukleotidů dlouhého) řetězce pre-mRNA přidána takzvaná čepička (m^7G , 7-methylguanosine cap), tj. atypicky (5' na 5') připojený a posléze methylovaný guaninový nukleotid. Další úpravou pre-mRNA je 3' polyadenylace, při které je nascentní transkript nejprve štěpen endonukleázovým komplexem asociovaným s C terminální doménou (CTD) polymerázy II a poté je na 3' konci dosyntetizován až několik stovek nukleotidů dlouhý poly-A řetězec. Tyto modifikace jsou zásadní pro transport mRNA z jádra, její stabilizaci a translaci.

Čepička na 5' konci také napomáhá vystřižení 5' proximálního intronu (vnitřní nekódující sekvence) [23]. Drtivá většina savčích pre-mRNA obsahuje větší počet intronů, které jsou v průměru desetkrát delší než exony (kódující sekvence). Introny musí být před transportem mRNA z jádra odstraněny právě procesem sestřihu, při němž je odstraněno v průměru 90% pre-mRNA. Proces vyštěpení intronů a pospojování exonů musí proběhnout naprosto přesně, aby nedošlo k posunutí čtecího rámce. Pokud zanedbáme minoritní typy sestřihu (AT-AC sestřih a introny, které se vyštěpují vlastní enzymatickou aktivitou), které u člověka představují jen asi 0.1% vyštěpených intronů, zajišťuje vysokou přesnost a efektivitu sestřihu makromolekulární komplex spliceosom, skládající se z pěti subkomplexů malých jaderných ribonukleoproteinů (snRNP – small nuclear ribonucleoprotein). Každá z těchto ribonukleoproteinových partikulí obsahuje svou příslušnou malou jadernou RNA (snRNA – small nuclear ribonucleic acid) U1, U2, U4, U5, nebo U6, které se podílejí na přesném rozeznání sestřihových míst a s největší pravděpodobností jsou také hlavním katalytickým agens celého spliceosomu [24]. Součástí spliceosomu je přibližně 300 různých proteinů, což z něj dělá jeden z nejsložitějších makromolekulárních komplexů v buňce [25]. Struktura spliceosomu a přesné funkce jednotlivých proteinů nebyly dosud objasněny.

Na přesnosti sestřihu se podílí řada interakcí mezi molekulami proteinů a RNA. Pomocí těchto interakcí jsou rozeznávány sekvenční motivy pre-mRNA na rozhraní intron/exon a uvnitř intronů. Jsou to: donorové 5' sestřihové místo na rozhraní exon/intron, sekvence větvicího bodu (BPS – branchpoint sequence), polypyrimidinová sekvence (py tract) a 3' sestřihové místo na rozhraní intron/exon (viz Obrázek 3). Sestřihové místo

na 5' rozhraní exon/intron má konsensus sekvenci AG↓GURAG (R = purin, Y = pyrimidin, ↓ označuje místo štěpení, tučně jsou zvýrazněny vysoce konzervované nukleotidy). Sestřihové místo na 3' rozhraní intron/exon má konsensus sekvenci YAG↓RNNN. Přibližně 30 nukleotidů upstream od 3' sestřihového místa leží sekvence větvicího bodu CURA^{2OH}Y (tučně je zvýrazněn samotný větvicí bod – adenin) následovaná polypyrimidinovou sekvencí.

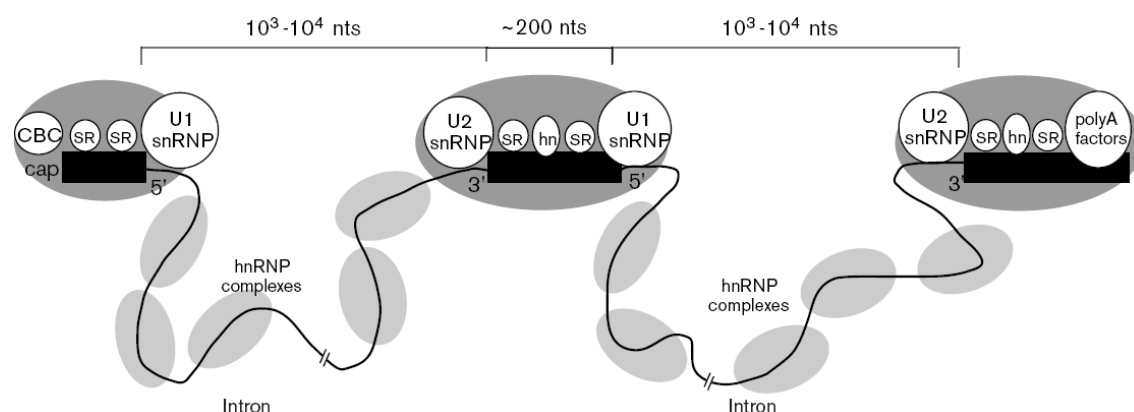


Obrázek 3: Schéma konsensus sekvenčních motivů důležitých pro rozeznání sestřihových míst. Převzato z: Reed et al., 1996

Mimo těchto konsensus sekvencí existují ještě další v exonech, které buď aktivují, nebo inhibují sestřih skrze interakce s proteinovými sestřihovými faktory. Tento mechanismus je důležitý zejména v alternativním sestřihu. Alternativní sestřih se uplatňuje u 70-80% lidských pre-mRNA transkriptů, které jsou tímto procesem zpracovány v různé výsledné mRNA [26]. Díky variabilitě v sestřihu může jediný gen dát vzniknout mnoha strukturně a funkčně různým proteinovým izoformám, což představuje významnou rovinu regulace vnitrobuněčných procesů. Použití, nebo nepoužití alternativních sestřihových míst je regulováno mimo jiné vazbou SR proteinů (serine/arginine rich) a heterogenních jaderných ribonukleoproteinů (hnRNP - Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) na exonové a intronové sekvence, které sestřih aktivují nebo inhibují [27]. Regulace alternativního sestřihu je vysoce tkáňově a vývojově specifická [28]. Chyby v alternativním sestřihu mohou mít vážné následky, dokonce se uvádí, že až 60% mutací způsobujících dědičná onemocnění ovlivňuje sestřih [29].

Sestřihový cyklus

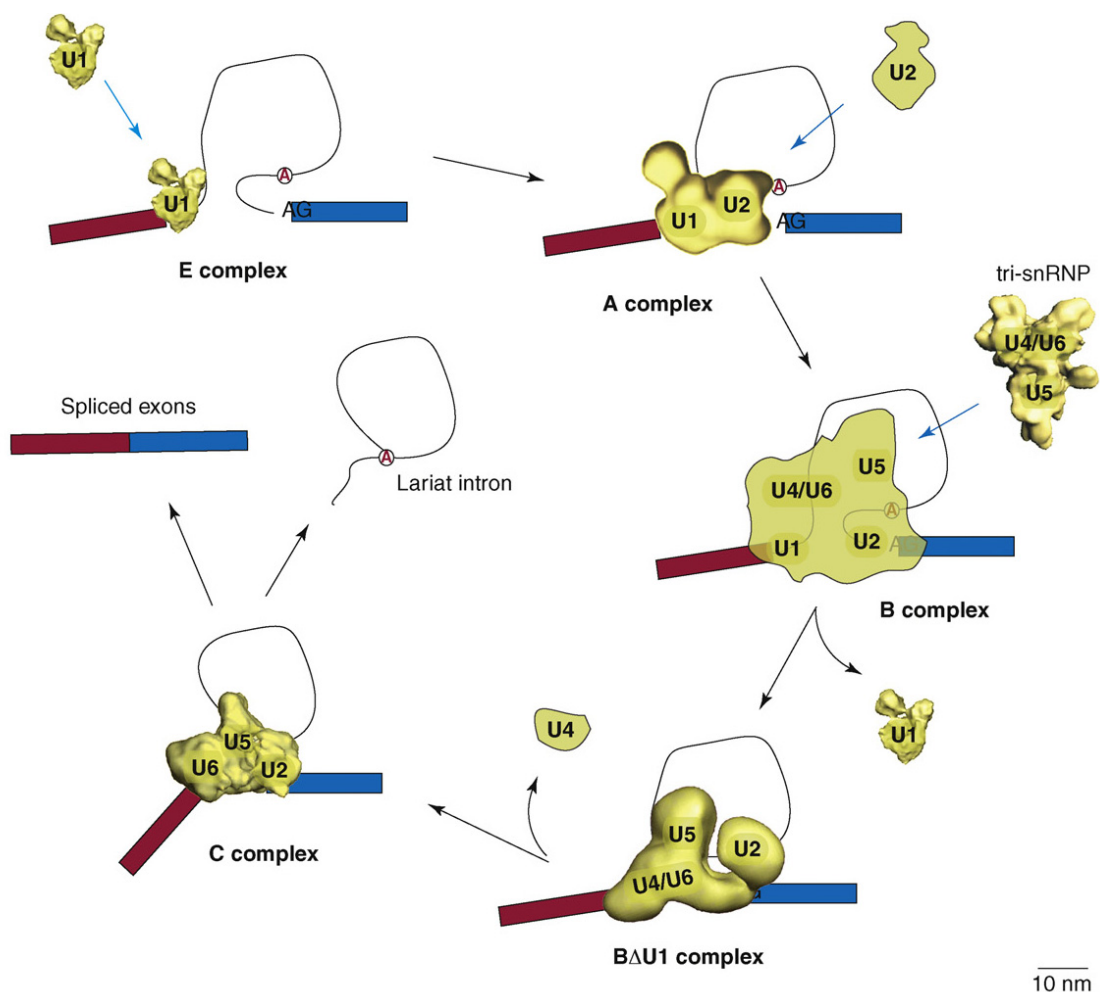
Rozeznání sestřihových míst, respektive časné kroky sestřihového cyklu, probíhají kotranskripčně a podílí se na nich velké množství proteinových faktorů, které nejsou přímo součástí jednotlivých snRNP, jako jsou SR a HN proteiny. Typická lidská pre-mRNA obsahuje několik intronů (v průměru osm) o délce $10^2 - 10^4$ nukleotidů, mnohem kratší exony (80% exonů je kratší než 200nt) a slabě konzervované sekvence sestřihových míst [30]. Podle současných představ, pokud je intron delší než 250 nukleotidů, je v časných krocích sestřihového cyklu větší pravděpodobnost, že dojde k rozeznání exonu a sestřihových míst, která ho ohraničují [31]. K sestavení funkčního spliceosomu a pokračování sestřihu pak musí dojít k přiblížení sousedních exonů, resp. U1 snRNP a U2 snRNP navázaných na okrajích intronu mezi nimi [32] (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma rozeznávání sestřihových míst přes exon definující komplexy. Převzato z: Reed et al., 2000

Nedávno bylo zjištěno, že tyto exon definující komplexy obsahují i U4/U6•U5 tri-snRNP, klíčovou komponentu nutnou k sestavení funkčního spliceosomu. U4/U6•U5 tri-snRNP asociovaný s exon definujícím komplexem pravděpodobně hraje zásadní roli v přechodu z exon definujícího komplexu ke komplexu spojujícímu oba konce intronu [33]. U1 snRNP rozeznává 5' sestřihové místo díky komplementaritě bazí U1 snRNA, nicméně tato vazba musí být stabilizována proteinovými faktory U1 snRNP. U2 snRNP rozeznává komplex proteinů navázaný na 3' sestřihové místo a sekvenci větvičího bodu (BPS – branch point sequence). Ten je tvořen na BPS navázaným proteinem SF1 (jinak také BBP - branch point binding protein), některými SR proteiny [34] a heterodimerním faktorem U2AF (U2 auxiliary factor). Vazba BBP na BPS je poměrně slabá a musí být

stabilizována interakcí právě s U2AF, jehož podjednotky rozeznávají polypyrimidinovou sekvenci a 3' sestřihové místo [35]. Vazba U2 snRNP na BPS je ATP dependentní a vystavuje konzervovaný adenosin do extrahelikální pozice důležité pro první sestřihovou transesterifikační reakci [36]. Po navázání U2 snRNP vzniká tzv. A komplex, ke kterému se na 5' sestřihové místo připojuje U4/U6•U5 tri-snRNP za vzniku B komplexu (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Schéma sestřihového cyklu se zohledněním přibližných strukturních vlastností jednotlivých snRNP jak se jeví při pozorování elektronovým mikroskopem. Měřítko se nevztahuje na zobrazenou pre-mRNA.

Převzato z: Rino a Carmo-Fonseca, 2009

Poté dochází k masivnímu přeuspořádání spliceosomu, tzv. spliceosomální aktivaci, kdy jsou rozvázány vazby mezi U4 a U6 snRNP a také mezi U1 snRNP a pre-mRNA. Na 5' sestřihové místo se místo U1 snRNP váže U6 snRNP a vytváří se dlouhý úsek

komplemetárního párování mezi U6 snRNA a U2 snRNA, což vzájemně přibližuje 5' sestřihové místo a BPS. U1 a U4 snRNP jsou z komplexu rozvolněny. Tyto strukturní změny vyžadující přísun energie ve formě ATP jsou katalyzovány evolučně konzervovanými DexD/H-box helikázami (např. Brr2 v případě rozvolnění vazby U4 a U2 snRNA [37]). Přestavěný U6-U5-U2 spliceosom, nazývaný také C komplex, katalyzuje vyštěpení intronu a spojení sousedních exonů. Hypotéza některých autorů, že spliceosom není tvořen v těchto postupných krocích, ale je přítomen jako kompletní prefabrikát, stále nebyla definitivně vyvrácena, ale jeví se jako velice nepravděpodobná [38].

Sestřihová reakce sama o sobě se sestává z dvou transesterifikačních reakcí. První je nukleofilní atak a navázání 2' hydroxylové skupiny konzervovaného adenosinu v BPS na 5' sestřihové místo, druhou pak nukleofilní atak a navázání 3' hydroxylové skupiny původního 5' sestřihového místa na 5' fosfát 3' sestřihového místa. Druhá reakce musí předcházet další strukturní přestavby v C komplexu spliceosomu [39]. Vyštěpený intron se uvolňuje ve formě lariátu a spliceosom se rozpadá [40].

Tvorba a recyklace snRNP

Tvorba snRNP byla díky *in vitro* experimentům považována za samovolný proces. Ukázalo se však, že *in vivo* se na něm podílí velké množství proteinových faktorů zprostředkovávajících jednotlivé kroky. Protein hPrp31, na který se v této práci zaměřuji, je součástí U4/U6•U5 tri-snRNP, váže U4 snRNA a je také jednou z komponent vytvářejících vazbu mezi U4/U6 a U5 snRNP, která se v průběhu sestřihového cyklu ruší. Zvláštní pozornost bude proto věnována dynamice U4/U6•U5 tri-snRNP.

Jednotlivé snRNP sdílejí některé společné znaky. Společným strukturním znakem snRNA je přítomnost tzv. Sm místa, na které se váží Sm proteiny ve formě stabilního kruhového heptameru. Určitou výjimku tvoří U6 snRNA, která má vlastní sadu tzv. Lsm proteinů (like Sm), je transkribována RNA polymerázou III, podstupuje odlišné kotranskripční úpravy a pravděpodobně v procesu tvorby U6 snRNP neopouští jádro [41, 42]. Zásadní je modifikace 3' konce U6 snRNA specifickou terminální uridylyl transferázou, která k němu dosyntetizuje různě dlouhý uridinový úsek [43]. Ostatní snRNA (U1, U2, U4, U5) jsou transkribovány RNA polymerázou II a kotranskripčně modifikovány tvorbou m⁷G čepičky na 5' konci. Čepička je rozeznávána komponentami

jaderného exportního komplexu (konkrétně CBC – cap-binding complex, PHAX – phosphorylated adaptor for RNA export, CRM1 – chromosome region maintenance 1 a Ran GTPázou [44]) a exportována do cytoplazmy, kde je vázána SMN (survival motor neuron) komplexem, který zajišťuje vazbu Sm proteinů na Sm místo. Po vazbě Sm proteinů dochází k hypermethylovaní m⁷G čepičky na m₃G (2,2,7-trimethylguanosine cap). Struktura m₃G je rozeznávána proteinem SPN1 (snurportin 1), který spolu s importinem β spouští import snRNP partikule zpět do jádra [45, 46]. Importované snRNP se v jádře dočasně akumulují v Cajalových tělíscích (subnukleární tělíska, která pozoroval poprvé v roce 1903 Santiago Ramón y Cajal), kde pomocí malých RNA Cajalova tělíska (scaRNA) dochází k pseudouridinylovaní a 2'-O-methylovaní snRNA, což je její finální posttranslační úpravou [47].

Cajalova tělíska jsou také místem, kde dochází k sestavování U4/U6•U5 tri-snRNP a to jak při vzniku *de novo*, tak při jeho znovusestavování [48-50]. Po rozpadu spliceosomu dochází k obnovení výše popsanými přestavbami rozloženého U4/U6•U5 tri-snRNP tak, aby mohl opět vstoupit do dalšího sestřihového cyklu [51]. Nejprve je sestavena partikule U4/U6 di-snRNP v procesu, který zahrnuje komplementární vazbu části U4 a U6 snRNA. Spouštěcím signálem při tvorbě *de novo* je 2',3' cyklická fosforylace 3' koncového uridinu U6 snRNA, která vede k výměně La proteinu za heteroheptamerní kruh proteinů Lsm 2-8 a následné vazbě U4/U6 recyklačního faktoru SART3 (jinak také hPrp24, nebo p110) [52, 53]. U5 snRNP se následně připojuje přes protein-proteinové interakce, ve kterých hraje zásadní roli protein hPrp31 [54] (Viz kapitola PRPF31). Ačkoliv se zdá, že tyto komplexy nejsou do Cajalových tělísek aktivně směřovány [55], existují studie dokazující, že rozrušení struktury Cajalových tělísek (ztrátou coilinu, jejich hlavní strukturní komponenty) způsobuje nedostatečné formování snRNP a sníženou životaschopnost a proliferaci buněk [56, 57].

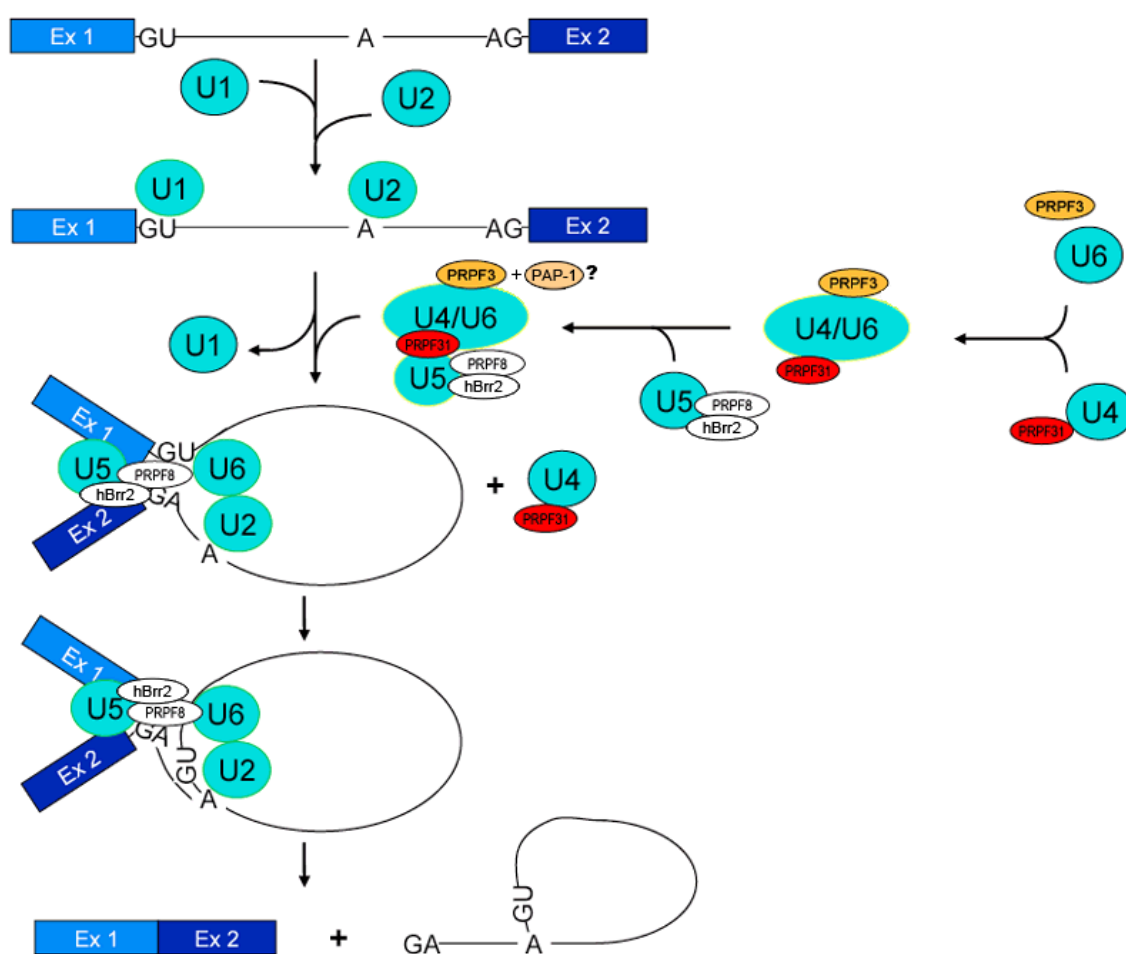
Pre-mRNA sestřih a retinitis pigmentosa

V onemocnění retinitis pigmentosa hraje roli mnoho dosud identifikovaných mutací ovlivňujících sestřih pre-mRNA. Můžeme odlišit dva typy těchto mutací. Cis mutace způsobují odchylky v sestřihu transkriptů postižených genů tím, že např. pozměňují jejich sestřihová místa, ovlivňují alternativní sestřih nebo vytvářejí nová místa sestřihu. Příklady těchto mutací jsou: mutace sestřihových míst genu RHO [58], xRP způsobující mutace 5' sestřihového místa genu RPGR (retinitis pigmentosa GTPase regulator) [59] nebo mutace genu PDE6B, která skrze chybu v sestřihu způsobuje arRP [60]. Druhou skupinou jsou trans mutace, které postihují geny kódující komponenty sestřihového aparátu, čímž mohou teoreticky ovlivňovat sestřih všech pre-mRNA transkriptů v buňce [61].

Jak již bylo zmíněno výše v kapitole věnované retinitis pigmentosa, je známo pět proteinů účastnících se sestřihu pre-mRNA, jejichž mutace vedou k tomuto onemocnění. Jde o sestřihové faktory hPrp31 (pre-mRNA processing factor 31 homolog, jinak také RP11, PRP31, PRPF31, 61 kDa U4/U6), hPrp3 (pre-mRNA processing factor 3 homolog, jinak také RP18, PRP3, PRPF3, 90 kDa U4/U6), hPrp8 (pre-mRNA processing factor 8 homolog, jinak také RP13, PRP8, 220 kDa snRNP, PRPF8), Pap-1 (Pim-1 associated protein, jinak také RP9) a konečně hBrr2 (Brr2 homolog, jinak také RP33, SNRNP200, HELIC2, U5-200kD). Všechny tyto proteiny jsou vysoce evolučně konzervované a jejich mutace jsou dohromady zodpovědné za zhruba desetinu všech případů adRP (mutace proteinu hBrr2 byly objeveny teprve nedávno a nejsou v tomto podílu zahrnuty) [62]. Všechny představují (s možnou výjimkou u Pap-1) naprosto nezbytné elementární součásti spliceosomu (viz Obrázek 6), bez nichž se žádná transkripčně aktivní buňka lidského těla neobejde. Jak je tedy možné, že mutantní formy těchto proteinů způsobují nemoc, která postihuje pouze sítnici oka a neohrožuje pacienty na životě?

Odpověď na tuto otázku není dosud známa. Byly navrženy různé modely vysvětlující mechanismus cytotoxického účinku mutací těchto všeobecných sestřihových faktorů specificky v buňkách fotoreceptorů. První model předpokládá, že onou specifickou vlastností fotoreceptorů důležitou pro vznik onemocnění, je jejich vysoký metabolický obrát a z něj vyplývající nároky na proteosyntézu, které vznikají v důsledku neustávající tvorby membránových disků a jejich postupného odlučování ve vnějších segmentech fotoreceptorů. Lze samozřejmě diskutovat míru nároků na proteosyntetický aparát v

jiných buněčných typech, nicméně existují jisté důkazy podporující například model tzv. haploinsuficience, který vychází z těchto předpokladů. Tato hypotéza předpokládá, že při ztrátě jedné funkční alely daného genu, dochází k nedostatečnosti sestřihu (respektive omezení množství funkčního U4/U6•U5 tri-snRNP), což vede k postupnému poškozování buněk právě proteosynteticky náročných fotoreceptorů. Pokud je nedostatečná procesivita sestřihového aparátu limitujícím faktorem celé proteosyntézy, buňka se může dostat do bludného kruhu, protože zvýšená transkripce sestřihových faktorů nemůže situaci zlepšit právě kvůli nedostatečnosti sestřihu a tvorbě mutantní formy.



Obrázek 6: Schéma účasti jednotlivých adRP asociovaných sestřihových faktorů na sestřihovém cyklu.

Adaptováno z: Mordes et al., 2006

Druhý model počítá s hypotetickou existencí dosud neobjeveného kofaktoru nebo kofaktorů specifických pro fotoreceptory, které by interagovaly s výše jmenovanými

sestřihovými faktory a představovaly tak pravou příčinu vzniku onemocnění. Tato možnost není zcela nereálná, zvláště uvažíme-li, že u 40% případů adRP není dosud známa žádná konkrétní příčina [62]. Obdobný model předpokládá dosud neobjevenou funkci těchto sestřihových faktorů v jiném buněčném procesu specifickém pro fotoreceptory. Pro tyto hypotézy však zatím nehovoří žádné důkazy.

Zajímavější je model tzv. získané toxicity, který předpokládá, že mutace ovlivní funkci sestřihového faktoru tak, že způsobí chybný sestřih pre-mRNA transkriptů genů specifických pro fotoreceptory a tím zrušení jejich funkce. K získané toxicitě také může vést hromadění nefunkční mutantní formy samotného sestřihového faktoru v buňce. Některé studie zdůrazňují roli fyziologických změn odehrávajících se v buňkách sítnice v důsledku změn hladiny kyslíku během cirkadiálního cyklu [63, 64]. Úloha těchto změn může skutečně být v mechanismu vzniku nemoci nezanedbatelná, protože na myších modelech RP byl různými autory ukázán vliv oxidačního stresu i hypoxie v procesu programované buněčné smrti fotoreceptorů (nejde zřejmě o klasickou apoptózu) [65-67]. Je však nutné podotknout, že ani jeden ze studovaných myších modelů nebyl vytvořen introdukcí mutantní formy sestřihového faktoru způsobujícího RP, protože žádný takový model se dosud nepodařilo vytvořit. U heterozygotních myší se fenotyp těchto mutací neprojevuje a homozygotní kombinace je letální [68, 69].

Toto je pouze sumarizace možných mechanismů cytotoxicity specifické pro jeden buněčný typ. Skutečný mechanismus je pravděpodobně u jednotlivých mutací sestřihových faktorů různý, může být i kombinací některých výše jmenovaných.

Sestřihové faktory v adRP

RP9

Gen RP9 (MIM ID *607331, lokalizace 7q14.3) obsahuje šest exonů (Ensembl) a kóduje protein PAP-1 o 221 aminokyselinách (aa), s molekulovou hmotností 26.1 kDa (UniProt Q8TA86). Mutace v něm byly poprvé identifikovány jako příčina RP typu 9 autory Keen et al. [70].

Funkce proteinu PAP-1 zůstává neobjasněna, ačkoli jsou známy některé jeho interakce s dalšími proteiny. PAP-1 asociuje s U2AF1 (U2AF 35 kDa), který se podílí na rozeznávání 3' sestřihového místa (viz kapitola Pre-mRNA sestřih). Také se váže na C terminální doménu sestřihového faktoru hPrp3 a je slabě asociovaný s U4/U6•U5 tri-snRNP [71]. Je současně vazebným partnerem Pim-1 kinázy, ačkoliv jí sám není *in vivo*

fosforylován [72]. Bylo ukázáno, že Pim-1 a PAP-1 asociovaný protein PAPA-1 hraje roli v regulaci buněčného cyklu [73, 74].

Byly identifikovány dvě mutace RP9, ale žádná neovlivňuje vazbu PAP-1 s hPrp3 [71]. Někteří autoři proto zpochybňují, že mutantní formy PAP-1 jsou příčinou RP typu 9 [62].

PRPF3

Gen PRPF3 (MIM ID *607301, lokalizace 1q21.1) obsahuje šestnáct exonů (Ensembl) a kóduje protein hPrp3 (UniProt O43395) o 683 aa, s molekulovou hmotností 77,5 kDa (UniProt O43395). Mutace v něm byly poprvé identifikovány jako příčina RP typu 18 autory Xu et al. [75].

Ve srovnání s proteinem PAP-1 je role hPrp3 v sestřihu nesrovnatelně lépe charakterizována. Jedná se o U4/U6 specifický sestřihový faktor nezbytný pro formování a stabilitu U4/U6•U5 tri-snRNP a jeho vazbu na A komplex spliceosomu. Tyto funkce jsou zajištěny skrze interakce hPrp3 s celou řadou dalších sestřihových faktorů.

S proteiny hPrp4 a 20 kDa cyklofilinem H (jinak také PPIH, CypH) tvoří heterotrimerní komplex v rámci U4/U6 di-snRNP (viz Obrázek 7) [76]. Asociace U5 snRNP s U4/U6 snRNP je mimo jiné zprostředkována vazbou hPrp3 s U5 tri-snRNP specifickými proteiny hSnu66, hPrp6 a hPrp8 [77]. Pro vazbu s hPrp8 je kritická posttranslační modifikace hPrp3 K63 oligoubiquitinylací, kterou zajišťuje komplex Prp19 (nebo také NTC – nineteen complex, komplex stabilně asociovaný s U5 snRNP složený z přibližně 30 proteinů [78, 79]), v tomto případě fungující jako E3 ubiquitin ligáza. Ubiquitinylovaný hPrp3 je rozeznáván JAMM doménou hPrp8, což je jedna z klíčových vazeb pro stabilizaci U4/U6•U5 tri-snRNP. Deubiquitinylací zajišťuje enzym Usp4 naváděný v tomto případě proteinem Sart3, který tak zřejmě propojuje rozpad U4/U6•U5 tri-snRNP při aktivaci spliceosomu s jeho recyklací (viz kapitola Tvorba a recyklace snRNP) [80]. Při aktivaci spliceosomu je totiž hPrp3 ze vznikajícího C komplexu na rozdíl od hPrp8 rozvolněn [81]. Pro integritu U4/U6 snRNP je nezbytná vazba hPrp3 na spárovaný úsek U4 a U6 snRNA (stem II) [82]. Dalším vazebním partnerem hPrp3 je protein SPF30, který tímto (podobně jako výše zmíněný PAP-1) zprostředkovává interakci U2AF1 s U4/U6•U5 tri-snRNP při formování spliceosomálního B komplexu [83]. Kináza CK2 (casein kinase 2) zajišťuje fosforylaci hPrp3, což je druhá a poslední dosud známá posttranslační modifikace hPrp3 [84].

Protein hPrp3 je vysoce evolučně konzervovaný, zejména jeho C terminální doména [85]. Tato doména je nejen substrátem enzymů katalyzujících obě posttranslační modifikace, ale i místem vazby proteinů hPrp6, PAP-1, hPrp8 a Sart3. Všechny tři dosud známé mutace hPrp3 způsobující adRP se nacházejí velice blízko sebe v exonu 11, právě v C terminální doméně. Jde o tři bodové missense mutace: Thr494Met (tranzice ACG-ATG), Pro493Ser (tranzice CCC-TCC) a Ala489Asp (transverze C-A) [86, 87].

Mutace Thr494Met byla nalezena v různých nepříbuzných rodinách postižených adRP po celém světě a molekulárně-biologická podstata její patogenity byla poměrně dobře popsána. Thr494 je totiž za normálních okolností fosforylován a pokud chybí je funkce hPrp3 zásadním způsobem ovlivněna. U mutantní formy bylo pozorováno oslabení vazby hPrp3 s hPrp6, hPrp4, U4 a U6 snRNA, které vede ke snížené proliferaci a životaschopnosti postižených buněk [88]. Dalším efektem této mutace je formování velkých vnitrojaderných agregátů proteinu hPrp3 specificky v buňkách fotoreceptorů, což vede k jejich odumírání [89]. Pro tuto mutaci tak zřejmě bude platit model získané cytotoxicity (viz výše), čemuž nasvědčují i výsledky jiných autorů [68].

PRPF8

Gen PRPF8 (MIM ID *607300, lokalizace 17q13.3) obsahuje 43 exonů (Ensembl) a kóduje protein hPrp8 o 2335 aa, s molekulovou hmotností 273.6 kDa (UniProt Q6P2Q9). Mutace v něm byly poprvé identifikovány jako příčina RP typu 13 autory Greenberg et al. [90].

Protein hPrp8 je komponentou U5 snRNP s nezastupitelnou rolí nejen ve formování U4/U6•U5 tri-snRNP, ale i v jeho rozpadu při spliceosomální aktivaci a zejména při samotné sestřihové reakci, které se na rozdíl od výše jmenovaných adRP asociovaných faktorů účastní jako součást aktivního C komplexu [91, 92]. Interaguje s širokou škálou sestřihových faktorů, jejichž seznam pravděpodobně zdaleka není kompletní, protože hPrp8 se kvůli své obrovské velikosti obtížně studuje.

Obdobně jako u hPrp3 jsou z hlediska onemocnění RP zajímavé zejména interakce C terminální domény hPrp8. Tato doména je velice silně evolučně konzervována a její struktura je známa [93]. Nachází se v ní všech devatenáct dosud popsanych mutací způsobujících adRP, které ovlivňují skladbu posledních 37 aminokyselin [94]. Tato doména váže proteiny hBrr2 a hSnu144 a je nezbytná pro funkci hBrr2, která rozvolňuje vazbu U4 a U6 snRNA [95]. V kvasinkách vede porušení této vazby

k hromadění nekompletního U5 snRNP (bez Brr2) v jádře a snížené procesivitě sestřihu [96]. Vzhledem k vysoké míře sekvenční homologie lidského a kvasinkového proteinu Prp8 (respektive hPrp8) lze očekávat podobný efekt, avšak zatím chybí experimentální data, a tak lze pouze konstatovat, že molekulárně-biologická podstata pathogenity mutací hPrp8 v adRP zůstává neobjasněna.

SNRNP200

Gen SNRNP200 (MIM ID *601664, lokalizace 2q11.2) obsahuje 45 exonů (Ensembl) a kóduje protein hBrr2 o 2136 aa, s molekulovou hmotností 244.5 kDa (UniProt O75643). Mutace v něm byly poprvé identifikovány jako příčina RP typu 33 teprve nedávno autory Zhao et al. [97].

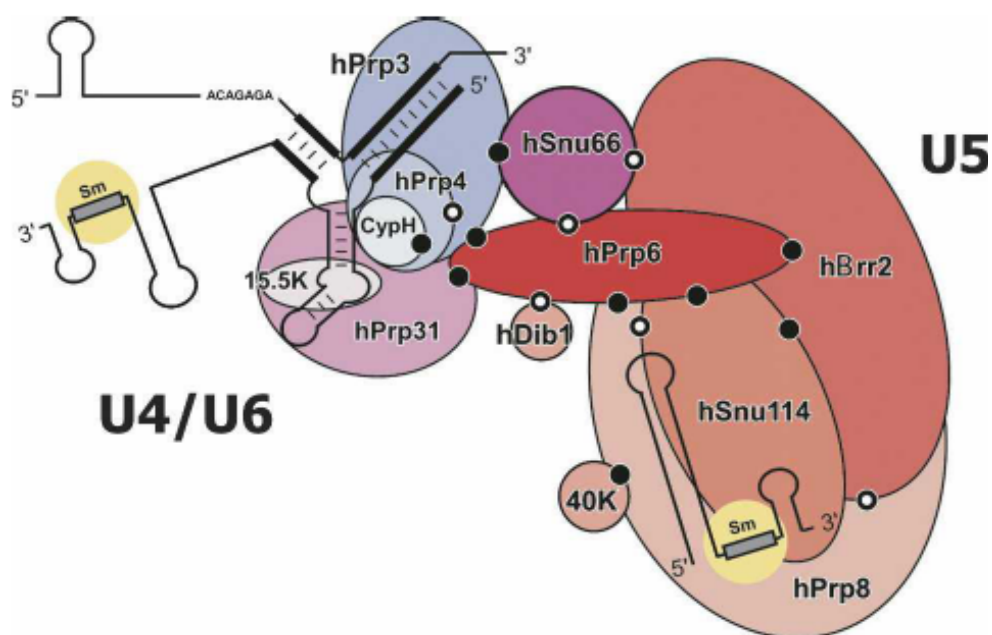
Protein hBrr2 je komponentou U5 snRNP a spolu s hSnu144 a hPrp8 tvoří jeho stabilní jádro [98]. Podobně jako hPrp8 je součástí spliceosomu během celého sestřihového cyklu, během kterého katalyzuje dvě nezbytné helikázové reakce. První z nich je již zmíněné rozvolnění duplexu U4 a U6 snRNA během aktivace spliceosomu, druhou pak rozvolnění duplexu U2 a U6 snRNA po proběhnutí sestřihové reakci [99, 100]. Obě dosud identifikované mutace (Ser1087Leu a Arg1090Leu) se nacházejí v N helikázovém modulu hBrr2, který se zřejmě neúčastní vazeb s hPrp8 a hSnu144, ale přímo katalytické aktivity [101]. Tomuto tvrzení založenému na *in silico* analýze odpovídají i projevy mutací v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, kde se neprojevuje defektní formování U4/U6•U5 tri-snRNP, ale dochází k narušení rozvolňování U4/U6 di-snRNP [97].

PRPF31

Gen PRPF31 (MIM ID *606419, lokalizace 19q13.4) obsahuje 14 exonů (Ensembl) a kóduje protein hPrp31 o 499 aa, s molekulovou hmotností 55.5 kDa (UniProt Q8WWY3). Mutace v něm byly poprvé identifikovány jako skutečná příčina RP typu 11 autory Vithana et al. [102].

Protein hPrp31 je komponentou U4/U6 di-snRNP zprostředkující vazbu mezi U4/U6 di-snRNP a U5 snRNP při formování U4/U6•U5 tri-snRNP. Tuto vazbu zajišťuje přes protein hPrp6 podobně jako u hPrp3 (viz Obrázek 7) [54]. Oba U4/U6 faktory klíčové pro vazbu U5 snRNP, tedy hPrp3 a hPrp31, váží snRNA a U5 faktor hPrp6, oba jsou zřejmě klíčové i pro vazbu U4/U6•U5 tri-snRNP na A komplex a oba jsou při aktivaci spliceosomu z B komplexu rozvolněny [54, 82, 103]. Pro stabilní integraci U4/U6•U5

tri-snRNP v spliceosomálním B komplexu je nutná aktivita kinázy hPrp4K, která fosforyluje hPrp31 a hPrp6 [104].



Obrázek 7: Model některých protein-proteinových interakcí v rámci U4/U6•U5 tri-snRNP (označeny tečkami).

Převzato z: Liu et al., 2006

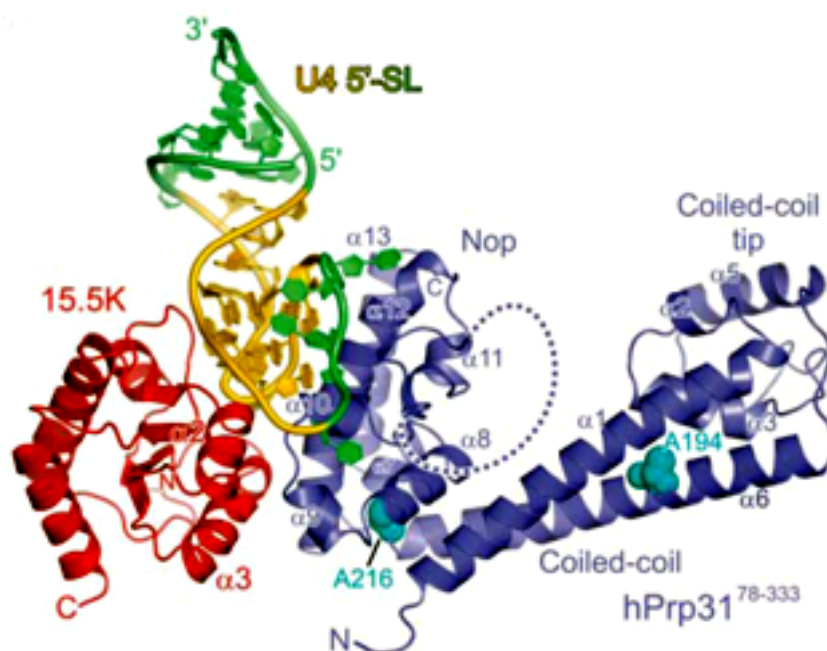
Zatímco vazbu s hPrp6 zajišťuje coiled-coil doména hPrp31, Nop doména váže protein hSnu13 (nebo také 15,5 kDa) rozeznávající specifickou strukturu úseku U4 snRNA. Strukturní model těchto interakcí byl vytvořen autory Liu et al. pomocí rentgenové krystalografie (RCSB PDB - ID 2ozb, viz Obrázek 8) [105].

Doposud bylo identifikováno 40 různých mutací (HGMD) v genu PRPF31 způsobujících přibližně 5% případů onemocnění adRP, což je druhý největší podíl u této formy RP [5, 62]. Přestože některé z těchto mutací jsou poměrně dobře charakterizovány, příčinu buněčné specificity jejich cytotoxických účinků se stále nepodařilo odhalit. Výsledky některých autorů ukázaly, že za tímto efektem stojí chyby v sestřihu některých genů exprimovaných specificky ve fotoreceptorech (jako například RHO, FCN2 a RDS), způsobené právě mutantními formami proteinu hPrp31 [106, 107]. Tyto studie však byly následně zpochybněny, protože využívaly exprese některých mutantních forem PRPF31, které ve skutečnosti exprimovány nejsou, nebo přinejmenším ne v takové míře. Ve skutečnosti totiž studované mutace vedou k vytvoření předčasných terminačních kodonů, což spouští degradaci pre-mRNA

mechanismem NMD (nonsense mediated decay). Tento kontrolní mechanismus se u expresních vektorů obsahujících cDNA mutantní PRPF31 neprojevuje, a tak lze efekty pozorované těmito autory označit za artefakt [108].

Mutací PRPF31 způsobujících vytvoření předčasných terminačních kodonů při transkripci je přinejmenším 29 a dalších 7 velkých delecí (až 59 kbp) má také za následek snížení množství proteinu hPrp31 v buňce [109]. Snížení množství tohoto proteinu způsobuje zhoršené formování U4/U6•U5 tri-snRNP a hromadění U4/U6 di-snRNP v Cajalových tělíkách, což koresponduje s jeho výše popsanou funkcí a naznačuje, že mechanismem vzniku nemoci by mohla být haploinsuficience [49]. Tomu odpovídají i výsledky dalších autorů, ukazující že nižší míra exprese wild-type alely PRPF31 (a tedy menší množství proteinu hPrp31 v buňce) koreluje s vyšší mírou penetrance (míra projevení fenotypu dědičné choroby, v tomto případě RP) [110, 111].

K vytvoření předčasných terminačních kodonů však nedochází u dvou bodových missense mutací v exonu 7. Jde o Ala216Pro (G646C tranzice) označovanou jako AD29 a Ala194Glu (C581A transverze) označovanou jako SP42. Mutace SP42 se nachází v coiled-coil doméně hPrp31 (viz Obrázek 8) a silně zeslabuje její vazbu s proteinem hPrp6, čímž negativně ovlivňuje formování U4/U6•U5 tri-snRNP a jeho stabilitu [105]. Tato mutace také způsobuje zhoršenou translokaci hPrp31 do jádra, čímž může způsobovat jeho lokální nedostatečnost, která by způsobovala obdobné problémy se sestřihem jako u výše popsaných mutací a naznačovala tak, že i zde se uplatňuje model haploinsuficience [112].



Obrázek 8: Model struktury části proteinu hPrp31 (aa 78-333) a jeho interakce s proteinem hSnu13 (15.5K) a U4 snRNA (5'-SL). Místa mutací AD29 (A216) a SP42 (A194) jsou zvýrazněna.

Převzato z: Sunbin Liu et al., 2007

Mutace AD29 také způsobuje zhoršenou translokaci hPrp31 do jádra, aniž by se nacházela přímo v NLS. Ovlivněna není ani interakce s importinem β1 a přímé měření jaderného importu neukázalo žádný rozdíl oproti wild-type proteinu [113]. Na rozdíl od situace u SP42 mutace AD29 vazbu s proteinem hPrp6 naopak zesiluje [114]. To může vést k problémům při formování a recyklaci U4/U6•U5 tri-snRNP a spliceosomální aktivaci, protože mutantní forma hPrp31 může takto vyvazovat hPrp6, aniž by předtím došlo ke kompletnímu zformování U4/U6 di-snRNP a U5 snRNP. Nedávno bylo skutečně ukázáno, že AD29 forma hPrp31 precipituje hPrp6 a naopak její schopnost interagovat stabilně v rámci snRNP komplexu je dramaticky snížena [115]. Stejná práce autorů Huranová et al. také ukazuje, že tato mutace způsobuje snížení životaschopnosti a proliferace buněk, narušuje formování Cajalových tělísek a rapidně zvyšuje degradaci AD29 formy oproti wild-type hPrp31. Negativní projevy AD29 mutace lze zvrátit umělým zvýšením exprese proteinu hPrp6, což spolu s faktem, že tyto výsledky byly získány studiem buněčné kultury exprimující normální množství endogenního wild-type hPrp31 ukazuje spíše na model získané toxicity. Nicméně je stále možné, že nedostatek funkčního proteinu hPrp31 nastává v důsledku rychlé degradace mutantní formy a

platný je model haploinsuficience. Jaká je reálná situace v buňkách fotoreceptorů zůstává otázkou. Hypotéza počítající s tkáňově specifickou izoformou proteinu hPrp31 byla vyvrácena [116]. Myší model adRP způsobené mutací AD29 se bohužel nepodařilo vytvořit [69].

Materiál a metody

Materiál

Přístroje

centrifugy	EBA 12R, rotor 1412 (Hettich Zentrifugen, Německo) Mini Spin (Eppendorf, Německo) Z 323 K (Hermle, Německo) RC-3B, rotor H 4000 (Sorvall Instruments, USA) Heraeus Multifuge 3S-R (Thermo Electron Corporation, Německo) J-21M, rotory JA-14, JA-21 (Beckman , USA)
spektrofotometry	Ultrospec 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Velká Británie) NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
souprava pro elektroforézu	Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, USA)
zdroj	EV243 (Consort, Belgie)
souprava pro horizontální agarosovou elektroforézu	(vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
FPLC	Äkta Basic, Äkta Prime (Amersham Bioscience, Velká Británie)
souprava pro WB	ISS-Enprotech (The W.E.P. Company, USA)
zdroj	EV243 (Consort, Belgie)
rotační inkubátory	INR-401 (Gallenkamp, Velká Británie) G25 (New Brunswick Scientific CO, USA) Orbital Incubator (Sanyo, Japonsko)
fázově kontrastní mikroskop	Carl Zeiss (Jena, Německo)
fluorescenční mikroskopie	DeltaVision [®] (Applied Precision, USA) systém s mikroskopem Olympus IX70 (Olympus, Japonsko)
laminární box	BSB 4A (Gelaire Flow Laboratories, Austrálie)

termostaty	TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) Sanyo CO2 Incubator (MCO-ATAI, Japonsko)
předvážky	PRS 620-3 (Kern, Německo) Adventur TM Pro AV2102CM (Ohaus, USA)
váhy	Owa labor (VEB Wägetechnik Rapido, Německo) Adventur TM Pro AV213CM (Ohaus, USA)
pH metr	GMH 3530 (Greisinger Electronic, Německo)
DLS aparatura	Spectroscatter 201 (RiNA, Německo)
sonikátory	Soniprep 150 MSE (Sanyo, Velká Británie) Sonic Dismembrator (Dynatech, Francie)
UV transiluminátor	Gel Doc XR+ System (Bio-Rad, USA)
třepačka	Rotamax 120 (Heidolph Instruments, Německo)
PCR	PCR cyclor Progene (Techne, USA)
konduktometr	GMH 3430 (Greisinger Electronic, Německo)
vodní lázeň	GRANT (P-lab, Česká republika)
vortex	MS2 Minishaker (Schoeller instruments, Česká republika) vortex (vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
magnetická míchačka	Jenway 1000 (Hotplate and Stirrer, Velká Británie)
hluboko-mrazicí box	Snijders (Scientific, Nizozemsko)
centrifugační koncentrátor	Speed Vac Concentrator Savant (Thermo Scientific, USA)
fotoanalyzátor luminiscence	LAS-3000 (FujiFilm, Japonsko)

Bakteriální kmeny a buněčné linie

One Shot Max Efficiency DH5aTM-T1^R *Escherichia coli* (Invitrogen).

Genotyp:

F- $\Delta(lacZYA-argF)U169$ *recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+)**phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 tonA*.

***Escherichia coli* BL21 (DE3)** (New England BioLabs)

Genotyp:

fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS

λ DE3 = λ *sBamHI* Δ *EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)* *i21 Δnin5*

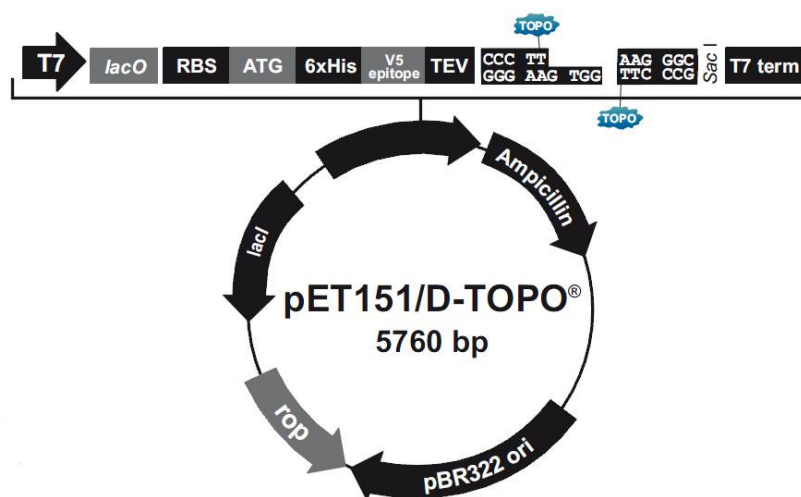
Bakteriální kmeny byly pěstovány za sterilních podmínek v LB médiu (tekutém nebo pevném). K selekci kolonií bylo použito antibiotikum ampicilin (Serva) v koncentraci 100 µg/ml.

HeLa buňky

HeLa buňky byly pasážovány v médiu DMEM (4,5 g/l glukózy) s 10% fetálním sérem s antibiotiky penicilin a streptomycin (Invitrogen).

Plazmidy a primery

pET151/D-TOPO[®] (Invitrogen, USA): expresní vektor umožňující snadné vložení insertu a expresi produktu spolu s histidinovou kotvou (6×His) a V5 epitopem oddělenými štěpným místem pro TEV proteázu (viz Obrázek 9).



Obrázek 9: Schéma uspořádání expresního vektoru pET151/D-TOPO[®]

Primery použité pro PCR amplifikaci vložených úseků AD29 a WT hPrp31:

forward 5' cacctcagaagtgatgggaccagt 3'

reverse 5' ctactcctgccacttgctgaatttg 3'

Primery byly vyrobeny firmou Metabion international AG.

Chemikálie

2-merkapt ethanol (BME)	Serva, Německo
4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, USA
agarosa	Bio-Rad, USA
akrylamid	Fluka, Švýcarsko
ampicilin	Biotika, Slovenská republika
bromfenolová modř	Lachema, Česká republika
deoxycholát sodný (DOC)	Sigma-Aldrich, USA
dihydrogenfosforečnan sodný	Lachema, Česká republika
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
ethanol	Penta, Česká republika
ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Lachema, Česká republika
ethyl-β-D-thiogalaktosid (ETG)	laskavě poskytl Jan Ježek, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.
formaldehyd	Lachema, Česká republika
glukosa	Penta, Česká republika
glycerol	Penta, Česká republika
glycin	Sigma-Aldrich, USA
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
hovězí zárodečné sérum (FBS)	Sigma-Aldrich, USA
hydroxid sodný	Lachema, Česká republika
chlorid hořečnatý	Sigma-Aldrich, USA
chlorid sodný	Lachema, Česká republika
imidazol	Fluka, Švýcarsko
kyselina chlorovodíková	Lachema, Česká republika
kyselina octová	Lachema, Česká republika

methanol	Penta, Česká republika
močovina	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid) (BIS)	Fluka, Švýcarsko
odtučněné mléko	Eligo, Česká republika
persíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, USA
thiosíran sodný	Lachema, Česká republika
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100	Merck, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
uhličitan sodný; Na ₂ CO ₃	Penta, Česká republika

Protilátky a enzymy

Primární protilátky:

α V5 (Serotec) - myší monoklonální protilátka proti V5 epitopu

α Prp31 - králičí polyklonální, vyprodukovaná ve spolupráci s oddělením biologických kontrol, FGÚ AV ČR, v.v.i.

α Prp31 - králičí polyklonální, laskavě poskytnutá Dr. Rivoltou

α coilin - myší monoklonální, laskavě poskytnutá Dr. Carmo-Fonsecovou

Sekundární protilátky:

α M-HRP (Sigma-Aldrich) - králičí polyklonální protilátka proti myším

imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou

α R-HRP (Sigma-Aldrich) – kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou

α R-TRITC (Jackson ImmunoResearch) kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s TRITC

α M-FITC (Jackson ImmunoResearch) kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s FITC

Enzymy

TEV proteáza	(rekombinantně připravovaná v laboratoři strukturní biologie, ÚMG AV ČR, v.v.i.)
Phusion TM	DNA polymeráza (Finnzymes)
Benzonase [®]	endonukleáza (Novagen)
PstI	restrikční endonukleáza (New England Biolabs)
SacI	restrikční endonukleáza (New England Biolabs)

Pufry

Některé často používané pufry:

PBS

10 mM hydrogenfosforečnan sodný; 1,8 mM dihydrogenfosforečnan draselný;
136 mM chlorid sodný; 2,6 mM chlorid draselný; pH 7,2

Pufry používané při izolaci a zpracování mutanty AD29 proteinu hPrp31:

Lyzační pufr (HA)

50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% BME (2-merkaptoethanol), complete protease inhibitor (Roche) 1 tableta/50 ml pufru, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Promývací pufr 1

50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% BME, 0,1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Promývací pufr 2

1 M NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% BME, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Promývací pufr 3:

50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% BME, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Denaturační pufr:

8 M močovina, 150 mM NaCl, 0,05% BME, 50 mM Tris, pH 8,0

Pufry a roztoky pro SDS-PAGE:

Elektrodotový pufr

200 mM glycín, 0,1% SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 8,3

Vzorkový pufr (RSB/SB)

20% (v/v) glycerol; 4% SDS; 0,2% (v/v) bromfenolová modř, 10% BME (v případě neredukující SDS-PAGE vynechán), 125 mM Tris pH 6,8

Fixační roztok

12% (v/v) CH₃COOH, 50% (v/v) methanol, 0,05% (v/v) formaldehyd

Barvicí roztok

12 mM AgNO₃, 0,075% (v/v) formaldehyd

Vyvolávací roztok

570 mM Na₂CO₃, 0,05% (v/v) formaldehyd, 16 μM Na₂S₂O₃

Sušicí roztok

20% ethanol a 3% glycerol

Pufry pro western blot (WB)

Přenosový pufr

200 mM glycín, 0,1% SDS, 20% (v/v) methanol, 20 mM Tris-HCl, pH 8,3

PBS-T

1x PBS, 0,05% Tween

Metody

Příprava expresního vektoru

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodou PCR byly z příslušné cDNA získány potřebné fragmenty WT a AD29 genu PRPF31 kódující aminokyseliny 78-333 pro tvorbu příslušných expresních vektorů. Reakční směs (celkový objem 25 μ l) byla připravena dle Tabulky 3 a amplifikace probíhala v cycleru Progene (Techne) za podmínek dle Tabulky 4.

templát/plasmid	0,2 μ l ~ 2ng
5x Phusion HF pufr	5 μ l
směs \bar{a} 10mM dNTPs	0,5 μ l
10 μ M primery (R+F)	\bar{a} 0,5 μ l
Phusion TM polymeráza	0,25 μ l
H ₂ O	18 μ l

Tabulka 3: Jednotlivé složky PCR reakční směsi a jejich objemy

krok č.	teplota/pokyn	čas [min]
1	98°C	0:30
2	98°C	0:10
3	72°C	0:30
4	72°C	0:40
5	zpět na krok 2, 35x	
6	72°C	7:00
7	4°C	stále

Tabulka 4: Program použitý pro PCR amplifikaci

Purifikace produktu PCR

Produkt PCR byl purifikován pomocí soupravy QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen). Tato souprava obsahuje všechny potřebné materiály k purifikaci PCR produktu mimo mikrocentrifugy. Všechny centrifugace byly prováděny na stolní mikrocentrifuze při 13000 RPM.

Nejprve byl k reakční směsi po provedení PCR přidán PB pufr v objemu 125 μ l (5x objem reakční směsi). Tato směs byla zvortexována a převedena do QIAquick kolonky v 2 ml mikrozkuhavce a centrifugována po dobu 60 sekund. Prošlá frakce byla odstraněna a QIAquick kolonka byla promyta 0,75 ml 35% roztoku guanidin hydrochloridu, který byl opět odstraněn 60 s centrifugací. Kolonka byla promyta ještě 0,75 ml PE pufru, který byl odstraněn po 60 s centrifugací. Po odstranění PE pufru byla kolonka centrifugována ještě dalších 60 s, aby byl odstraněn veškerý zbylý PE pufr. Kolonka byla poté přendána do nové 1,5 ml mikrozkuhavky, do které byla eluována DNA z kolonky 50 μ l EB pufru při 60 s centrifugací. Integrita a velikost purifikovaného produktu PCR (insertu) byla pozorována pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Koncentrace produktu byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

TOPO klonovací reakce

Pro TOPO klonování byl využita souprava TOPO[®] Cloning (Invitrogen). Tato reakce využívá enzymu topoizomerázy I, která je přímo součástí vektoru a zajišťuje orientované vložení insertu pomocí rozeznání jeho konců (v tomto případě tedy záleželo na správném navržení primerů podle instrukcí výrobce).

V 1,5 ml mikrozkuhavce byla vytvořena reakční směs postupným přidáváním těchto složek:

1. 3 μ l sterilní vody
2. čerstvý purifikovaný PCR produkt ideálně v molárním poměru 1:1 s pET151/D-TOPO[®] vektorem (cca. 1,1 μ l)
3. 1 μ l roztoku solí 200mM NaCl, 10mM MgCl₂
4. 1 μ l pET151/D-TOPO[®] vektoru (15 – 20 ng/ μ l)

Tato směs byla jemně zamíchána a ponechána při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Poté byly 3 μ l směsi přidány do mikrozkuhavky se 100 μ l kompetentních buněk (One Shot Max Efficiency DH5 α [™]-T1^R *Escherichia coli*, Invitrogen). Tato směs byla jemně zamíchána a ponechána po dobu 30 min na ledu. Poté byly kompetentní buňky vystaveny teplotnímu šoku 42 °C po dobu 30 s a ihned vráceny zpět na led. Bylo k nim přidáno 250 μ l S.O.C. média o pokojové teplotě a byly po dobu jedné hodiny inkubovány v rotačním inkubátoru G25 při 150 RPM a 37 °C. Poté bylo 50 μ l této kultury vyseto na plotnu s LB agarem s přidáním ampicilinem. Plotna byla inkubována přes noc při 37 °C.

Preparace plazmidové DNA v malém měřítku

K preparaci plazmidové DNA byla použita souprava QIAprep[®] Spin Miniprep. Tato souprava obsahuje všechny potřebné materiály k preparaci plazmidové DNA z bakteriální kultury mimo mikrocentrifugy. Všechny centrifugace byly prováděny na stolní mikrocentrifuze při 13000 RPM, pokud není uvedeno jinak.

Vybrané kolonie narostlé po TOPO klonovací reakci byly přes noc kultivovány v 5 ml LB média s přidaným ampicilinem (100 µg/ml) při 37°C v rotačním inkubátoru při 150 RPM. Získaná kultura byla centrifugována 5 minut při 5000 RPM v centrifuze Mini Spin. Po odstranění supernatantu byla peleta bakteriálních buněk resuspendována v 250 µl P1 pufru (s přidanou RNAsou A o konc. 100 µg/ml a LyseBlue přípravkem). Poté bylo k této suspenzi přidáno 250 µl pufru P2 a směs byla promíchána. Po přidání 350 µl pufru N3 byla směs důkladně promíchána, dokud nedošlo k úplnému barevnému přechodu z modré na bezbarvou (díky indikátoru LyseBlue). Vzniklé sraženiny byly jako peleta odstraněny po 10 min centrifugací a supernatant byl převeden do QIAprep kolonky vložené do mikrozkušavky a centrifugován 60 s. Prošlý roztok byl odstraněn a kolonka byla promyta 750 µl pufru PE, který byl také odstraněn po 60 s centrifugací. Zbytkový PE pufr byl odstraněn další 60 s centrifugací a vektorová DNA navázaná na kolonce byla eluována 50 µl EB pufru do čisté mikrozkušavky. Získaný produkt byl analyzován pomocí horizontální agarózové elektroforézy a jeho koncentrace byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

Restrikční analýza

Restrikční analýza vektorů získaných preparací v malém měřítku z různých kolonií byla provedena pomocí restrikčních endonukleáz PstI a SacI (New England BioLabs) najednou v pufru NEBuffer 1 (New England BioLabs), ve kterém má PstI aktivitu 75% a SacI aktivitu 100%. *In silico* bylo simulováno vložení insertu do vektoru ve správné a opačné orientaci a vliv na velikost štěpných fragmentů při úplném digestu těmito enzymy (viz Tabulka 5).

Orientace insertu ve vektoru	Velikost štěpných produktů [bp]
správně	4900, 1080, 540
opačně	5200, 1080, 240

Tabulka 5: Velikosti štěpných fragmentů při úplném digestu vektoru s vloženým insertem ve správné, či opačné orientaci enzymy PstI a SacI podle *in silico* analýzy.

Reakční směs obsahovala vždy: 6 μ l sterilní vody, 0,5 μ l enzymu PstI, 0,5 μ l enzymu SacI, 1 μ l pufru 10x NEBuffer 1 a 2 μ l DNA (~ 50 – 100 ng DNA). Reakce probíhala 1,5 hod při teplotě 37°C. Velikost produktů štěpné reakce byla analyzována pomocí horizontální agarózové elektroforézy.

Expresa a zpracování rekombinantních proteinů

Transformace kompetentních buněk

Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21 (DE3) byly transformovány 1 μ l expresního vektoru (25 – 50 ng DNA) na jednu mikrozkušavku se 100 μ l kompetentních bakterií rozmrazených na ledu. Směs byla inkubována 30 min na ledu a poté byla vystavena teplotnímu šoku 42 °C po dobu 30 s a ihned vrácena na led. Bylo k ní přidáno 900 μ l LB média a byla 1 hod inkubována v rotačním inkubátoru při 37°C a 150 RPM. Poté bylo 500 μ l této kultury rozetřeno na velkou (průměr 20 cm) plotnu s LB agarem obohaceným 1% glukózou a ampicilinem (100 μ g/ml). Plotna byla inkubována přes noc při 37°C.

Kolonie narostlé na plotně z ní byly smyty 10 ml LB média s ampicilinem, u výsledné suspenze byla v ředění 1:50 změřena OD₅₅₀ na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* a podle této hodnoty bylo jejím odpovídajícím množstvím zaočkováno 500 ml LB média s přídavkem 2,5 ml 85% glycerolu a ampicilinu o koncentraci 100 μ g/ml tak, aby výsledná OD₅₅₀ odpovídala pokud možno hodnotě 0,1.

Kultivace bakteriální kultury a exprese rekombinantního proteinu

Při kultivaci byly každou hodinu od zaočkování média odebírány vzorky kultury pro analýzu na fázově kontrastním mikroskopu (100 μ l kultury + 10 μ l formaldehydu) a SDS-PAGE (100 μ l kultury, centrifugováno 13000 RPM, 10 min; peleta rozmíchána a rozvařena 10 min ve 100°C). Bakteriální kultura (500 ml v 2l Erlenmayerově baňce)

byla kultivována v rotačním inkubátoru Gallenkamp při 37°C a 200 RPM až do chvíle, kdy dosáhla hodnoty OD₅₅₀ přibližně 0,8. Poté byla přemístěna do rotačního inkubátoru Sanyo temperovaného na 20°C a po cca. 0,5 hod kultivace při 20°C a 200 RPM (při hodnotě OD₅₅₀ přibližně 1 – 1,5) byla indukována exprese rekombinantního proteinu přidáním ETG na koncentraci 0,05 mM. Kultura byla poté kultivována další 3 hod za stejných podmínek.

Zpracování biomasy

Bakteriální kultura byla po skončení kultivace centrifugována v předem zvážených kyvetách při 5000 RPM, 4°C po dobu 20 min. Získaná biomasa byla resuspendována v lyzačním HA pufru v poměru 10 ml HA pufru na gram biomasy. Suspenze byla třikrát zmrazena a opět rozmrazena, poté k ní byl přidán lysozym (25 mg na 50 ml suspenze) a byla za stálého míchání inkubována 30 min ve vodní lázni o teplotě 37°C. Poté byla směs přendána do ledové lázně a byl k ní přidán deoxycholát sodný (DOC) do výsledné koncentrace 0,05%. Tato směs byla na ledové lázni za stálého míchání inkubována 20 min. Získaný bakteriální lyzát byl poté v nádobě na ledové tříšti sonikován na sonikátoru Dynatech Sonic Dismembrator (amplituda 60%, doba podle viskozity lyzátu). Cytosolická frakce (CS) byla oddělena centrifugací při 15000 RMP, 4°C, 20 min v centrifuze Beckmann.

Peleta tvořená z velké části inkluzními tělísky a znečištěná zbytky buněčných stěn byla dále čištěna. Nejprve byla resuspendována v promývacím pufru 1 v poměru 10 ml promývacího pufru na gram biomasy. Suspenze byla sonikována na sonikátoru Dynatech Sonic Dismembrator (amplituda 60%) a poté centrifugována při 15000 RMP, 4°C, 20 min v centrifuze Beckmann. Supernatant byl odstraněn a tento postup byl zopakován s promývacími pufrů 2 a 3. Z každé oddělené frakce byl odebrán vzorek na SDS-PAGE analýzu, aby byly zjištěny případné ztráty produktu (rekombinantního proteinu). Získaná vyčištěná inkluzní tělíska byla buď hluboce zamrazena na -70°C, nebo rovnou dále zpracována.

Zpracování vyčištěných inkluzních tělísek

Vyčištěná inkluzní tělíska byla rozpuštěna v denaturačním pufru na koncentraci 50 mg/ml. Pro dokonalé rozpuštění inkluzních tělísek bylo nutné roztok sonikovat na sonikátoru Dynatech Sonic Dismembrator (amplituda 60%), přičemž byla hlídána teplota roztoku tak, aby nedošlo k jeho přehřátí ani podchlazení, které by vedlo ke

srážení močoviny. Případné nerozpuštěné části byly odděleny centrifugací (15000 RPM, 20 min, 20 °C, Beckmann J-14M). Roztok rozpuštěných inkluzních tělísek byl poté čištěn pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči. Vyčištěný produkt byl poté renaturován pomalým ředěním (po kapkách) 1:49 v renaturačním pufru (0,01 M ethanolamin, 1 mM EDTA, pH 11) za stálého míchání. Poté byl dialýzou převeden do pufru vhodného pro štěpení TEV proteázou.

Štěpení TEV proteázou

K vzorku převedenému do pufru vhodného pro štěpení TEV proteázou (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH 8.0) bylo přidáno 1,2 ml roztoku s 0,3 mg TEV proteázy rekombinantně připravované v laboratoři strukturní biologie, ÚMG AV ČR, v.v.i. Reakční směs byla inkubována přes noc při 4°C a poté převedena do vázacího pufru. TEV proteáza a případný neštěpený produkt byly odstraněny pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči. Produkt byl finálně purifikován pomocí ionexové chromatografie na nosiči DEAE Sepharose Fast Flow.

Chromatografické metody

Chelatační chromatografie

Purifikace pomocí chelatační chromatografie na nosiči Ni-CAM HC Resin byla použita ve dvou různých krocích zpracování rekombinantního produktu za různých podmínek. V obou případech byl roztok proteinu před nanesením na kolonu centrifugován (15000 RPM, 20 min, Beckmann J-14M). Kolona byla vždy před nanesením roztoku proteinu promyta 10 objemy kolony resp. nosiče (V_c) destilované vody pro odstranění 20% ethanolu, v kterém byla skladována, a dále ekvilibrována 10 V_c nanášecího pufru. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 5 V_c nanášecího pufru a 10 V_c nanášecího pufru s přídavkem 15 mM imidazolu pro odstranění nespecificky navázaných proteinů. Navázané proteiny byly poté eluovány 5 V_c nanášecího pufru s přídavkem 200 mM imidazolu. Objem jímaných frakcí odpovídal V_c . Rychlost průtoku byla přibližně 1 ml/min. Vzorky všech frakcí s obsahem proteinů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Chelatační chromatografie za denaturačních podmínek:

nanášecí pufr = denaturační pufr (8M močovina, 150mM NaCl, 0,05% BME, 50mM Tris, pH 8,0)

Chelatační chromatografie po TEV štěpení renaturovaného produktu:

nanášecí pufr = 300 mM NaCl, 0,05% BME, 50 mM NaH₂PO₄·2H₂O, pH 8,0

prováděna při 4°C

Ionexová chromatografie

Ionexová chromatografie byla provedena na FPLC aparatuře Äkta Prime v koloně Tricorn GE s použitím nosiče DEAE Sepharose Fast Flow při 4°C a maximálním tlaku 1 MPa. Teoretický izoelektrický bod štěpeného produktu je 5,41 (ExPASy). Kolona byla promyta HPLC vodou a ekvilibrována filtrovaným a odvzdušněným renaturačním pufrem při průtoku 4 ml/min. Bylo ověřeno, že vodivost vzorku je menší než vodivost samotného renaturačního pufru na konduktometru GMH 3430. Vzorek byl nanesen v renaturačním pufre při průtoku 1,2 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta promývacím pufrem (50 mM NaH₂PO₄·2H₂O, pH 8,0) a poté byla provedena eluce lineárním gradientem do 100% elučního pufru (1 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄·2H₂O, pH 8,0), obojí při průtoku 1,2 ml/min. Eluční profil byl zaznamenán spektrofotometricky pomocí UV₂₈₀. Vzorky všech frakcí s obsahem proteinů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (gelová filtrace) byla provedena na FPLC aparatuře ÄKTA Basic v koloně Superdex 200 10/300 GL Tricorn při průtoku 0,5 ml/min a tlaku maximálně 1,5 MPa. Kolona byla nejprve promyta HPLC vodou a ekvilibrována nanášecím pufrem (300 mM NaCl, 0,05% BME, 50 mM NaH₂PO₄·2H₂O, pH 8,0), ve kterém byl poté nanesen i vzorek. Eluční profil byl zaznamenán spektrofotometricky pomocí UV₂₈₀. Vzorky všech frakcí s obsahem proteinů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Kalibrační přímka byla vytvořena pomocí kalibrace kolony standardem molekulárních hmotností obsahujícím: aprotinin (6,5 kDa), cytochrom C (12,4 kDa), karbonická anhydrasa (29 kDa), albumin (66 kDa) a dextran blue (2 MDa).

Elektromigrační metody

SDS-PAGE

K rozdělení směsi proteinů podle molekulových hmotností byla použita diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Tato metoda byla prováděna na aparatuře Mighty Small II SE 250. Dělicí gel obsahoval 12,5% akrylamid (pokud není uvedeno jinak), který byl připravován smícháním stejných dílů zásobních roztoků 10% a 15% akrylamidu (akrylamid (AA) a N,N'-metylen-bis-akrylamid (BIS) v hmotnostním poměru BIS:AA 1:36,5; 375mM; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1%; Tris pH 8,8). Polymerace byla iniciována přidáním SDS, persíranu amonného (APS) a TEMED, vše na koncentraci 0,1% (v/v). Zaostřovací gel obsahoval 5% AA a BIS ve stejném poměru jako dělicí gel, 1mM EDTA, 0,5% (v/v) glycerol, 125mM Tris pH 6,8. Polymerace byla iniciována stejně jako u dělicího gelu.

Vzorky byly před nanesením smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 2:1 (pokud není uvedeno jinak) a vařeny 5 minut při 100°C. Jako standard byl používán buď mix Broad Range (Biorad) pro barvení stříbrem, nebo barevně odlišený Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas) pro WB. Jako konduktivum byl používán elektrodový pufr. Pro průchod proteinů zaostřovacím gelem bylo aplikováno napětí 110 V po dobu 12 minut, poté byl aplikován výkon 3 W na jeden gel, dokud čelo s bromfenolovou modří nedosáhlo spodního konce skla. Poté byl gel vyjmut z aparatury a barven stříbrem.

Western blot (WB)

Přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu byl po ukončení SDS-PAGE prováděn polosuchou metodou na aparatuře ISS-Enprotech. Gel, nitrocelulózová membrána (Hybond-C Extra) a blotovací filtrační papíry (Whatman) byly ekvilibrovány 5 min v přenosovém pufru a naskládány na anodu, tak aby vytvořily tzv. sendvič (shora dolů: blotovací filtrační papír, gel, membrána, blotovací filtrační papír). Případné bubliny, které by bránily přenosu, byly odstraněny rolováním skleněnou trubičkou. Po přiklopení katodou a připojení ke zdroji byl na 1 cm² membrány aplikován konstantní elektrický proud 1,5 mA po dobu 1 hod. Přenos byl zkontrolován reversibilním barvením membrány barvivem Ponceau S, které následně bylo odstraněno destilovanou vodou a PBS-T.

Následující kroky imunodetekce proteinů přenesených na membránu probíhaly za stálého míchání; membrána byla položena stranou s přenesenými proteiny vzhůru. Membrána byla blokována 5% roztokem odtučněného mléka v PBS-T a poté dvakrát 5 min promyta samotným PBS-T. Po odstranění PBS-T byla membrána inkubována 1 hod v roztoku primární protilátky v 1% odtučněném mléku v PBS-T 1:1000 a opět dvakrát 5 min promyta samotným PBS-T. Po jeho odstranění byla 1 hod inkubována v roztoku sekundární protilátky v 5% odtučněném mléku v PBS-T 1:10000 a opět dvakrát 5 min promyta samotným PBS-T.

Výsledek byl vizualizován přidavkem substrátu křenové peroxidázy SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate a digitálně zaznamenán pomocí aparatury LAS-3000.

Horizontální agarózová elektroforéza

K analýze vzorků DNA a oddělení jejich složek podle velikosti byla použita horizontální agarózová elektroforéza. Vzorky byly děleny v 1% agarózovém gelu (3g agarózy na 300ml 1x TBE pufru). Gel byl rozeřát v mikrovlnné troubě, bylo do něj přidáno 5 µl GelStar (Cambrex) na 50 ml gelu a poté byl nalit do připravené aparatury. Gel ztuhl v aparatuře s vnořeným desetijamkovým hřebínkem. Ten byl poté opatrně vyndán a gel byl zalit 1x TBE puftrem. Vzorky byly obarveny 6x DNA LoadingDye (Fermentas) a naneseny do jamek. Vzorky byly děleny při napětí 80V přibližně 1 hodinu (podle postupu čela gelem). Gel byl vyfocen v přístroji Gel Doc XR+.

10x TBE pufr (Tris/borát/EDTA): 0,89 M Tris, 0,89M kyselina boritá, 20mM EDTA

Ostatní metody

Příprava lyzátu HeLa buněk

Pro přípravu buněčného lyzátu byly napěstovány HeLa buňky v 8 cm² misce do konfluence přibližně 80%. Bylo odsáto médium a buňky přichycené na dně byly dvakrát promyty vychlazeným (4°C) PBS, který byl poté odsát. Poté bylo do misky přidáno 400µl NET-2 pufru a buňky byly seškrábány do mikrozkuřavky. Tato suspenze byla sonikována (2x 60 impulsů, amplituda 60%) a centrifugována při 5 000 RPM, 4°C po dobu 4 min. Supernatant byl převeden do čisté mikrozkuřavky.

NET-2 pufr: 150mM NaCl, 0,05% NP-40, 50mM Tris-HCl pH 7,4

Dialýza

Pro změnu pufru, v kterém byl produkt rozpuštěn, byla vždy použita dialýza za stálého míchání dialyzátu při teplotě 4 °C. Roztok produktu byl převeden do dialyzační membrány (“střeva“) s mezní propustností 10 kDa pro globulární proteiny a umístěn do dialyzátu. Dialyzát byl třikrát po 12 hodinách vyměněn za čerstvý (pokud byl poměr retentát:dialyzát menší než 1:100 pak vícekrát). Po dialýze byly případné agregáty z retentátu odstraněny centrifugací (15000 RPM, 20 min, 4 °C, Beckmann J-14M).

Ultrafiltrace

Ultrafiltrace byla použita k zahuštění proteinových roztoků a odstranění agregátů produktu z roztoku. Při obojím byl vzorek centrifugován v koncentrátorech Amicon® Ultra (Millipore) při 4 °C a odstředivém zrychlení doporučeném výrobcem (5000 g). Koncentrace vzorku probíhala na membráně s mezní propustností 10 kDa pro globulární proteiny. Odstranění agregátů ze vzorku probíhalo na membráně s mezní propustností 50 kDa pro globulární proteiny.

Barvení SDS-PAGE gelů stříbrem

Vzorky proteinů rozdělených na SDS-PAGE gelu byly vizualizovány stříbrem. Všechny kroky byly prováděny za stálého mírného míchání. Nejdříve byly proteiny v gelu fixovány 0,5 hod ve fixačním roztoku. Následně byl gel postupně třikrát po dobu 5 min omýván 50% (v/v) roztokem methanolu, poté byl 30 sekund omýván 0,8 mM roztokem Na₂S₂O₃ krátce opláchnut destilovanou vodou. Poté byl barven 20 min v barvicím roztoku, opláchnut destilovanou vodou a barvení bylo vyvoláno ve vyvolávacím roztoku. Barvení gelu bylo zastaveno roztokem 12% (v/v) kyseliny octové a 50% (v/v) methanolu a poté byl gel uchován v 50% (v/v) methanolu. Pro snazší focení obarveného gelu byl tento 20 min máčen v sušicím roztoku a sušen v napnutém celofánu.

Spektrofotometrická měření

Koncentrace DNA a čistého proteinového produktu byla stanovena pomocí spektrofotometrického měření. K obojímu byl použit přístroj NanoDrop ND-1000 a výrobcem poskytnutý software pro jeho použití. Teoretický molární extinkční koeficient rekombinantního proteinového produktu je při UV₂₈₀ přibližně 0,6 M⁻¹ cm⁻¹ (ExPASy). Pro měření OD₅₅₀ při kultivaci bakteriálních kultur byl použit přístroj Ultrospec 3100*pro*.

Fluorescenční mikroskopie

Na čtyřech sterilních mikroskopických krycích sklíčkách byla v šestijamkové destičce napěstována kultura HeLa buněk. Byla zkontrolována konfluence narostlých buněk a poté byla sklíčka vyjmuta a přendána do čisté šestijamkové destičky stranou s narostlými buňkami vzhůru. Buňky byly třikrát omyty vychlazeným Mg-PBS, 10 min fixovány 4% paraformaldehydem (PFA) a poté opět třikrát omyty vychlazeným Mg-PBS. Permeabilizace buněčných membrán byla provedena působením 0,2% roztoku Triton X-100 po dobu 5 min. Buňky byly poté opět třikrát omyty vychlazeným Mg-PBS. Následující kroky již neprobíhaly v jamkách destičky, ale volně v kapkách na parafilmu (Parafilm[®] M, BRAND) na které byla sklíčka pokládána tak, aby byla vždy smáčena strana s narostlými buňkami. Blokování bylo provedeno 5% kozím sérem po dobu 15 min, které bylo poté odmyto Mg-PBS. Inkubace jednotlivých sklíček v roztocích primárních protilátek trvala 1 hod ve vlhké komůrce. Všechny primární protilátky byly ředěny 1:500 v 3% BSA v PBS. Použité protilátky a ředění sekundárních protilátek podle Tabulky 6.

sklíčko	primární protilátka	sekundární prot.	ředění sek. prot.
1	α coilin	α M-FITC	1:50
2	vyprodukovaná α hPrp31	α R-TRITC	1:100
3	α coilin	α M-FITC	1:50
	vyprodukovaná α hPrp31	α R-TRITC	1:100
4	žádná	α M-FITC	1:50
		α R-TRITC	1:100

Tabulka 6: Použité protilátky a ředění sekundárních protilátek pro jednotlivá sklíčka

Po inkubaci v roztocích primárních protilátek byla sklíčka třikrát omyta v Mg-PBS a poté inkubována v roztocích sekundárních protilátek po dobu 1 hod ve vlhké komůrce bez přístupu světla. Poté byla sklíčka opět třikrát omyta v Mg-PBS a smočena v deionizované vodě. Po oschnutí byla sklíčka přiklopena do cca. 2 μ l kapky glycerolu/DAPI/2,5% DABCO na podložní sklíčku a připevněna pomocí laku. Výsledek byl pozorován pomocí DeltaVision[®] systému v kombinaci s mikroskopem Olympus IX70 (objektiv 60x 1,4 NA, imerze). Pro každý výsledný obraz bylo

zaznamenáno 25 sekcí v z-ose s krokem 200 nm, které byly následně prolнутy do jedné vrstvy matematickou dekonvolucí v programu SoftWorx (Applied Precision).

Dynamic light scattering (DLS)

Metoda DLS slouží ke stanovení rychlosti Brownova pohybu částic v roztoku, která je posléze vztažena k velikosti (resp. poloměru) částic pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice. Výpočet je prováděn pomocí měření fluktuace intenzity rozptýleného paprsku laseru při průchodu vzorkem v čase. Zesilovač přitom zvyšuje citlivost detekce rozptýleného světla a softwarová analýza využívá autokorelační funkce, takže přístroj dosahuje přesných výsledků.

K DLS analýze byl použit přístroj Spectroscatter 201 (RiNA) a software dodaný výrobcem. Všechny vzorky byly před samotnou analýzou ve speciální kyvetě zfiltrvány a centrifugovány v mikrozkuvkách při 15000 RPM, 15 min, 4°C.

Imunizace

Při produkci protilátky byla nejprve pomocí WB testována séra tří králíků na případnou autoreaktivitu proti proteinu hPrp31 v lyzátu HeLa buněk. Pro další postup byl vybrán králík č. 3, jehož přirozené protilátky reagovaly s proteiny HeLa lyzátů nejméně. Autoreaktivita proti proteinu hPrp31 nebyla zaznamenána. Vybranému králíku bylo odebráno 25 ml krve a byl imunizován důkladně smísenou suspenzí (až do formy husté pěny) 1,5 ml roztoku s obsahem 200 µg čistého produktu (AD29 hPrp31 78-333) s 1,5 ml kompletního Freudova adjuvans. Týden po každé imunizaci byla vždy odebrána krev (cca. 1,5 ml séra po centrifugaci) a získané sérum bylo pomocí WB analýzy testováno na reaktivitu proti proteinům lyzátu HeLa buněk. Další imunizace proběhla s odstupem 20 dnů od první imunizace suspenzí 0,75 ml roztoku s obsahem 100 µg čistého produktu se stejným objemem nekompletního Freudova adjuvans. Poslední imunizace proběhla s odstupem 28 dnů od druhé imunizace suspenzí 0,75 ml roztoku s obsahem 100 µg čistého produktu se stejným objemem nekompletního Freudova adjuvans. Po třetí imunizaci již nedošlo k zvýšení reaktivity *ahPrp31* protilátek, a tak byl králík usmrčen a odebráno celé sérum.

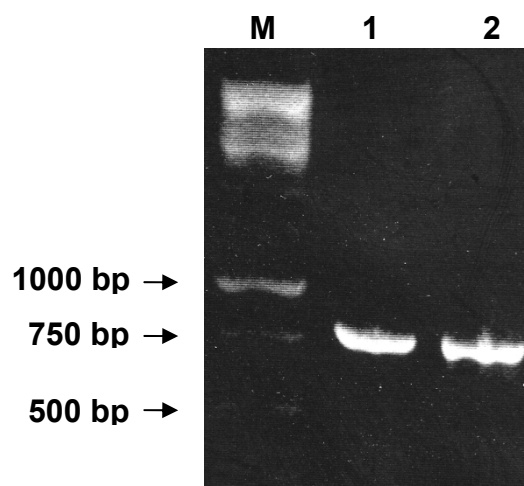
Výsledky

Mutace AD29 v genu PRPF31 kódujícím nezbytnou komponentu sestříhového aparátu lidských buněk, protein hPrp31, je spojená s fenotypem autozomálně dominantní retinitis pigmentosa. Mechanismus vzniku tohoto zrakového postižení a jeho specifita pro buňky fotoreceptorů a pigmentového epitelu sítnice zůstává nejasná. Ačkoliv se tato bodová mutace vedoucí k záměně alaninu za prolin nenachází v doméně interagující s U4 snRNA předchozí výsledky naší laboratoře ukázaly, že se protein nesoucí mutaci AD29 neinkorporuje do U4 snRNP komplexu [115]. Pro pochopení strukturního základu pozorovaného fenotypu by bylo užitečné získat údaje o struktuře mutantního proteinu a jakým způsobem uvedená mutace ovlivňuje strukturu proteinu a specificky domény vážící U4 snRNA. V následujících subkapitolách jsou prezentovány výsledky pokusů zahrnujících klonování, expresi, purifikaci a charakterizaci rekombinantního proteinu nesoucího mutaci AD29.

Exprese AD29 hPrp31 (78-333)

Příprava expresního vektoru

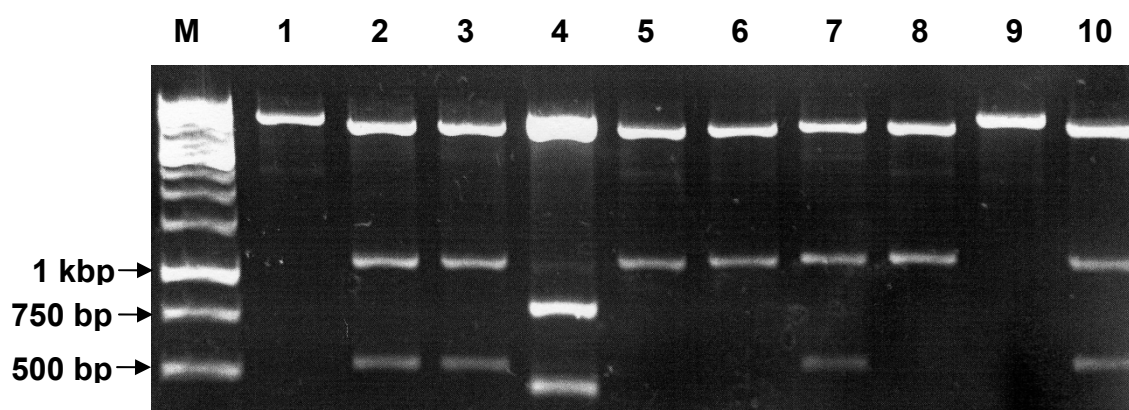
Výchozí plazmid obsahující kompletní cDNA hPrp31 nesoucí mutaci G646C označovanou jako AD29 (AD29-YFP [115]) byl použit jako templát pro PCR. Primery byly navrženy tak, aby splňovaly požadavky pro topoizomerázovou reakci klonování do použitého komerčního expresního vektoru pET151/D-TOPO[®] a aby ohraničovaly úsek templátu kódující aminokyseliny 78 – 333. Produkt PCR byl vyčištěn a výsledek PCR amplifikace byl analyzován pomocí horizontální agarózové elektroforézy (viz Obrázek 10). Vyčištěný amplifikovaný úsek byl použit v TOPO klonovací reakci.



Obrázek 10: Vyčištěný produkt PCR analyzovaný pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Amplifikovaný úsek má velikost 768 bází.

M = standard molekulárních hmotností 1 a 2 = dvě paralelní PCR reakce

Produktem TOPO reakce byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* DH5α a z deseti kolonií byla připravena plazmidová DNA k restrikční analýze, pomocí níž byla ověřena orientace insertu ve vektoru. Výsledek štěpení enzymy PstI a SacI je ukázán na Obrázku 11. Velikost fragmentů 4900 bp, 1080 bp a 540 bp odpovídající požadované orientaci insertu ve vektoru byla nalezena v klonech č. 2,3,7 a 10.



Obrázek 11: Výsledek restrikčního štěpení analyzovaný pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Velikost fragmentů 4900 bp, 1080 bp a 540 bp odpovídá požadované orientaci insertu ve vektoru.

M = standard molekulárních hmotností 1 - 10 = označení kolonií z nichž byla připravena plazmidová DNA

Plazmidová DNA z několika takto identifikovaných klonů byla dále podrobena sekvenační analýze s využitím T7 forward a T7 reverse primerů (laskavě provedeno v laboratoři Dr. J. Felsberga v MBÚ AV ČR, v.v.i.), díky čemuž bylo možno zkontrolovat celou exprimovanou sekvenci (viz rekonstrukce ze sekvenačních dat na Obrázku 12) i její okolí ve vektoru, což se ukázalo jako zásadní, neboť některé klony obsahovaly chybu způsobující posun čtecího rámce v oblasti těsně předcházející místu integrace insertu do vektoru.

```

57  ATG CAT CAT CAC CAT CAC CAT GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG GAA
    Met His His His His His His Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Glu

123  AAC CTG TAT TTT CAG GGA ATT GAT CCC TTC ACC TCA GAA GTG ATG GGA CCA GTG GAG GCC GCG CCT
    Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ile Asp Pro Phe Thr Ser Glu Val Met Gly Pro Val Glu Ala Ala Pro

189  GAA TAC CGC GTC ATC GTG GAT GCC AAC AAC CTG ACC GTG GAG ATC GAA AAC GAG CTG AAC ATC ATC
    Glu Tyr Arg Val Ile Val Asp Ala Asn Asn Leu Thr Val Glu Ile Glu Asn Glu Leu Asn Ile Ile

255  CAT AAG TTC ATC CGG GAT AAG TAC TCA AAG AGA TTC CCT GAA CTG GAG TCC TTG GTC CCC AAT GCA
    His Lys Phe Ile Arg Asp Lys Tyr Ser Lys Arg Phe Pro Glu Leu Glu Ser Leu Val Pro Asn Ala

321  CTG GAT TAC ATC CGC ACG GTC AAG GAG CTG GGC AAC AGC CTG GAC AAG TGC AAG AAC AAT GAG AAC
    Leu Asp Tyr Ile Arg Thr Val Lys Glu Leu Gly Asn Ser Leu Asp Lys Cys Lys Asn Asn Glu Asn

387  CTG CAG CAG ATC CTC ACC AAT GCC ACC ATC ATG GTC GTC AGC GTC ACC GCC TCC ACC ACC CAG GGG
    Leu Gln Gln Ile Leu Thr Asn Ala Thr Ile Met Val Val Ser Val Thr Ala Ser Thr Thr Gln Gly

453  CAG CAG CTG TCG GAG GAG GAG CTG GAG CGG CTG GAG GAG GCC TGC GAC ATG GCG CTG GAG CTG AAC
    Gln Gln Leu Ser Glu Glu Glu Leu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Cys Asp Met Ala Leu Glu Leu Asn

519  GCC TCC AAG CAC CGC ATC TAC GAG TAT GTG GAG TCC CGG ATG TCC TTC ATC CCA CCC AAC CTG TCC
    Ala Ser Lys His Arg Ile Tyr Glu Tyr Val Glu Ser Arg Met Ser Phe Ile Pro Pro Asn Leu Ser

585  ATC ATT ATC GGG GCA TCC ACG GCC GCC AAG ATC ATG GGT GTG GCC GGC GGC CTG ACC AAC CTC TCC
    Ile Ile Ile Gly Ala Ser Thr Ala Ala Lys Ile Met Gly Val Ala Gly Gly Leu Thr Asn Leu Ser

651  AAG ATG CCC GCC TGC AAC ATC ATG CTG CTC GGG GCC CAG CGC AAG ACG CTG TCG GGC TTC TCG TCT
    Lys Met Pro Ala Cys Asn Ile Met Leu Leu Gly Ala Gln Arg Lys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Ser

717  ACC TCA GTG CTG CCC CAC ACC GGC TAC ATC TAC CAC AGT GAC ATC GTG CAG TCC CTG CCA CCG GAT
    Thr Ser Val Leu Pro His Thr Gly Tyr Ile Tyr His Ser Asp Ile Val Gln Ser Leu Pro Pro Asp

783  CTG CGG CGG AAA GCG GCC CGG CTG GTG GCC GCC AAG TGC ACA CTG GCA GCC CGT GTG GAC AGT TTC
    Leu Arg Arg Lys Ala Ala Arg Leu Val Ala Ala Lys Cys Thr Leu Ala Ala Arg Val Asp Ser Phe

849  CAC GAG AGC ACA GAA GGG AAG GTG GGC TAC GAA CTG AAG GAT GAG ATC GAG CGC AAA TTC GAC AAG
    His Glu Ser Thr Glu Gly Lys Val Gly Tyr Glu Leu Lys Asp Glu Ile Glu Arg Lys Phe Asp Lys

915  TGG CAG GAG TAG
    Trp Gln Glu ---

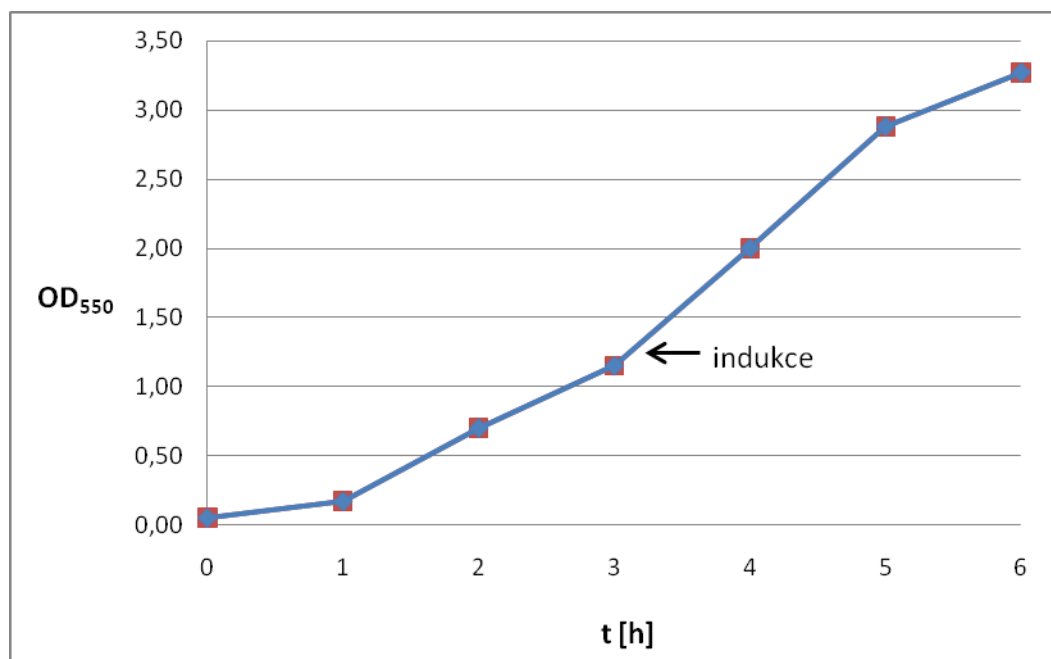
```

Obrázek 12: In silico rekonstrukce sekvence exprimovaného úseku. Žlutě je vyznačeno místo mutace AD29 (Ala216Pro)

Podmínky a výsledky exprese

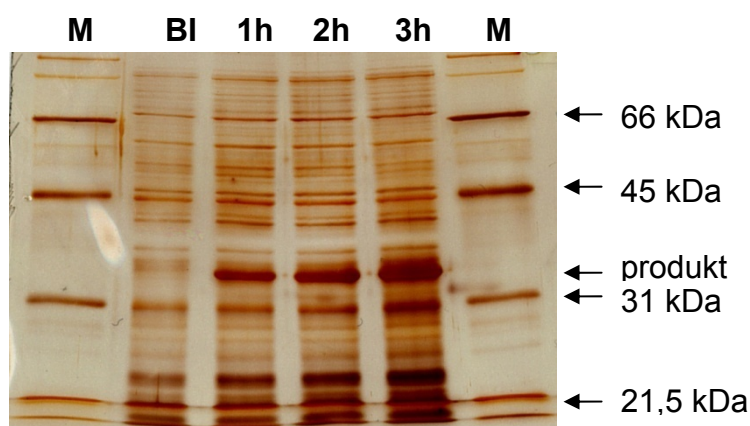
K expresi byl použit kmen *E. coli* BL21(DE3), standardně používaný pro vektory umožňující indukovatelnou expresi řízenou T7 promotorem. Kultivace probíhala za snížené teploty 20°C a indukce exprese byla provedena minimální koncentrací 0,05 mM ETG (růstová křivka viz Obrázek 13). Přesto byla pomocí fázově kontrastní

mikroskopie pozorována tvorba inkluzních tělísek po indukci v buňkách odebíraných a fixovaných v hodinových intervalech.



Obrázek 13: Typická růstová křivka bakteriální kultury při expresi AD29 mutantní formy proteinu hPrp31

Tvorba produktu kódovaného expresním vektorem (His_6 kotva, V5 epitop, místo štěpení TEV proteázou a úsek AD29 hPrp31 78-333, dále označován jen jako produkt) byla ověřena pomocí SDS-PAGE a western blotu. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázcích 14 a 15.



Obrázek 14: SDS-PAGE analýza vzorků bakteriální kultury odebraných při expresi AD29 mutantní formy proteinu hPrp31. Vzorky byly 6x ředěny RSB.

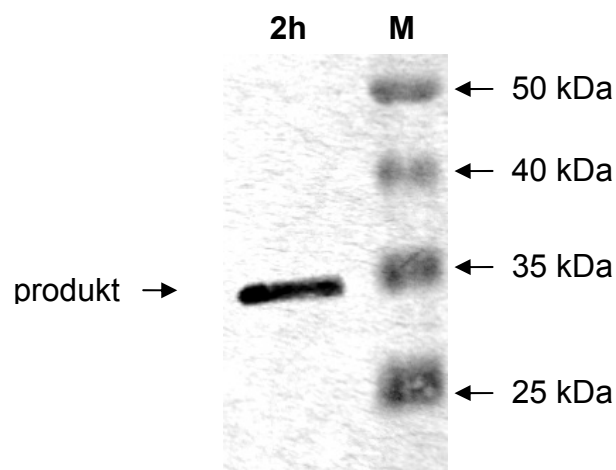
M = standard molekulárních hmotností BI = vzorek před indukcí

1h = vzorek 1h po indukci

2h = vzorek 2h po indukci

3h = vzorek 3h po indukci

Patrná je nadprodukce před indukcí nepřítomného proteinu o hmotnosti přibližně odpovídající produktu kódovanému vytvořeným expresním vektorem (32,3 kDa).

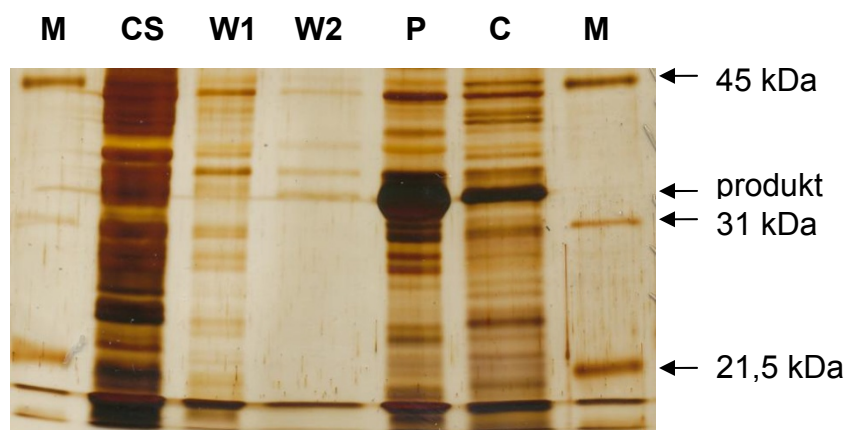


Obrázek 15: WB analýza vzorku odebraného při kultivaci bakteriální kultury 2 hodiny po indukci. Primární protilátka: myší α V5. Sekundární protilátka: králičí α myší konjugovaná s křenovou peroxidázou.

M = standard molekulárních hmotností 2h = vzorek 2h po indukci

Produkt kódovaný expresním vektorem má molekulární hmotnost 32,3 kDa (ExPASy).

Přítomnost produktu v inkluzích byla potvrzena SDS-PAGE analýzou vzorků získaných při oddělení cytosolické frakce a čištění inkluzí (viz Obrázek 16). Výtěžek biomasy získané po šesti hodinách kultivace činil průměrně 8 g vlhké biomasy na 1 l kultivačního média.



Obrázek 16: SDS-PAGE analýza vzorků odebraných při oddělení cytosolické frakce a čištění inkluzí

M = standard molekulárních hmotností	CS = cytosolická frakce
W1 = čištění promývacím pufrém 1	W2 = čištění promývacím pufrém 2
P = vzorek vyčištěných inkluzí	C = kontrola, vzorek 3h po indukci

Renaturace

Pokusným čištěním cytosolické frakce chelatační chromatografií bylo potvrzeno, že obsah rozpustné formy produktu v této frakci je zanedbatelný oproti obsahu nerozpustné formy v inkluzních tělískách (výsledky neuvedeny). Snaha optimalizovat protokol kultivace bakteriální kultury a indukce exprese produktu nevedla k zvětšení podílu rozpustného produktu v cytosolické frakci, a tak bylo nutné přistoupit k izolaci produktu spočívající v rozpouštění vyčištěných inkluzních tělísek v denaturačním pufru a následné renaturaci produktu.

Pro rozpouštění inkluzních tělísek se osvědčil denaturační pufr o složení: 8 M močovina, 0,15 M NaCl, 50 mM Tris, 0,05% 2-merkptoethanol, pH 8. Pro nalezení vhodného renaturačního pufru byla malá množství očištěných inkluzních tělísek (20 μ l o koncentraci 50mg/ml) rozpouštěných v denaturačním pufru renaturována rozředěním (1:49) v testovaných renaturačních pufrech (viz Tabulka 7). Poté byla testována tvorba precipitátu v těchto roztocích po šestnáctihodinové inkubaci při teplotě 4°C a 20°C.

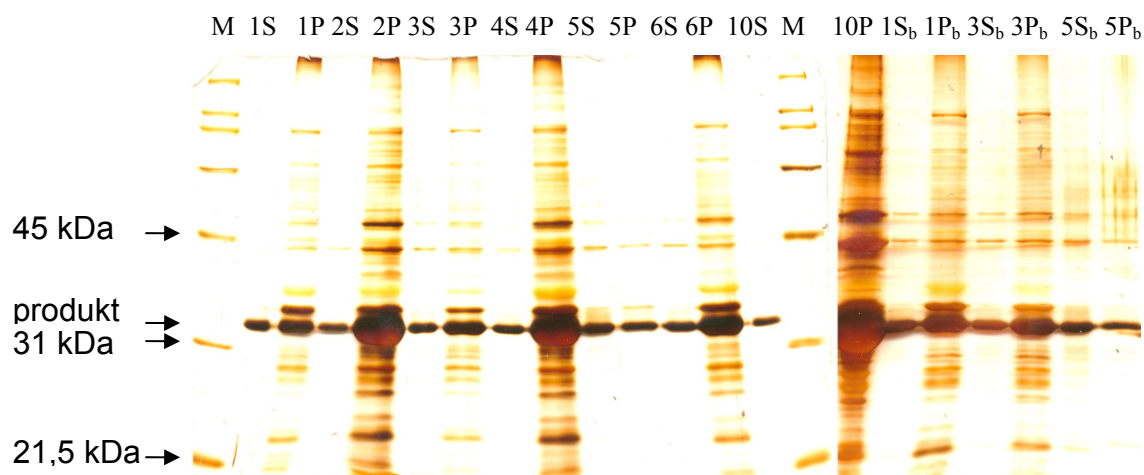
Pufr č.	Složení	pH
1	0,1 M Tris, 0,1 M glutamin	8,3
2	0,1 M Tris, 0,1 M arginin.HCl	8,2
3	0,1 M Tris, 0,1 M glutamin, 25% glycerol	8,1
4	0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA	8,3
5	0,01 M ethanolamin, 1 mM EDTA	11
6	0,01 M ethanolamin, 1 mM EDTA, 0,1 M arginin.HCl	8,6
7	0,1 M NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, 0,01 M glutamin	6,8
8	0,1 M NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, 0,1 M arginin.HCl, 0,1 M NaCl, 0,01 M glutamin	6,8
9	0,01 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,01 M glutamin	7
10	10 mM Tris-HCl, 0,12 M NaCl, 2 mM DTT	7,6

Tabulka 7: Přehled složení testovaných renaturačních pufrů.

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí pozorování tvorby precipitátu v roztocích vzorků a velikosti pelet po jejich centrifugaci (viz Tabulka 8) a pomocí SDS-PAGE analýzy (viz Obrázek 17).

Pufr č.	Viditelný precipitát (4°C)	Peleta (4°C)	Viditelný precipitát (20°C)	Peleta (20°C)
1	ne	ne	ne	malá
2	ne	malá	ne	velká
3	ne	ne	ne	malá
4	ne	malá	ne	malá
5	ne	ne	ne	ne
6	ne	malá	ne	malá
7	ano	velká	ano	velká
8	ano	velká	ano	velká
9	ano	velká	ano	velká
10	ne	malá	ano	velká

Tabulka 8: Výsledky pozorování precipitace a tvorby pelet v jednotlivých renaturačních pufrách



Obrázek 17: SDS-PAGE analýza vzorků supernatantů a pelet po centrifugaci jednotlivých testovacích roztoků. Některé vzorky, v nichž tato analýza jen potvrdila předchozí pozorování nejsou zobrazeny (vzorky z roztoků 7, 8 a 9).

M = standard molekulárních hmotností 1 - 10 = číslo renaturačního pufru
(dle Tabulky 7)

S = supernatant

P = peleta

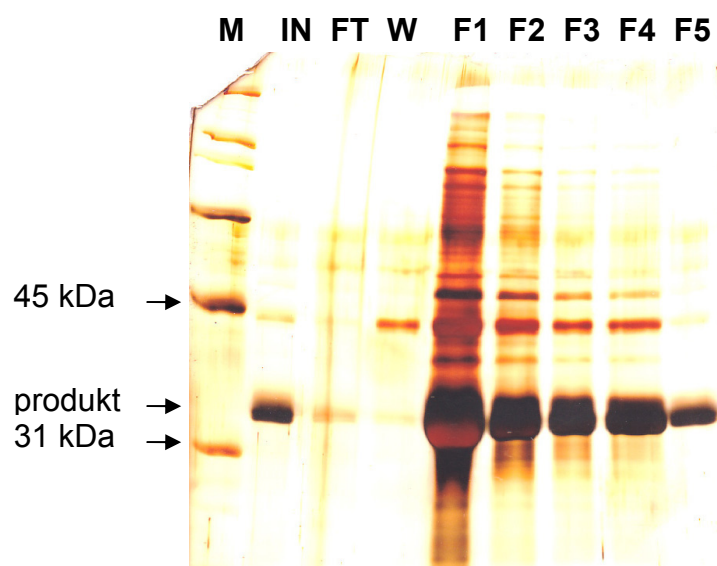
index _b značí vzorky z roztoků inkubovaných ve 20°C, bez indexu jsou vzorky inkubované ve 4°C

vzorky supernatantu jsou 1:1 s RSB, vzorky pelety byly připraveny rozpuštěním a rozvařením celé pelety ve 20 µl RSB

Z těchto výsledků vyplývá, že jako nejvhodnější z testovaných renaturačních pufrů se ukázal pufr č. 5, který jako jediný netvořil viditelné pelety ani po inkubaci ve 20°C. Analýza pomocí SDS-PAGE ukázala, že vzorky pelety z roztoku č. 5 jako jediné obsahují menší nebo srovnatelné množství produktu i při inkubaci ve 20°C. Tento pufr byl dále používán a označován jako renaturační pufr.

Purifikace a štěpení TEV proteázou

Přítomnost histidinové kotvy (His₆) na N-konci exprimovaného úseku byla využita pro purifikaci pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči. Průběh chelatační chromatografie byl monitorován pomocí SDS-PAGE analýzy vzorků jednotlivých frakcí (viz Obrázek 18). Nejlépe se osvědčilo provedení chelatační chromatografie ještě v denaturačních podmínkách.



Obrázek 18: SDS-PAGE analýza průběhu chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči za denaturačních podmínek.

M = standard molekulárních hmotností IN = nános (čištěné rozpuštěné inkluze)

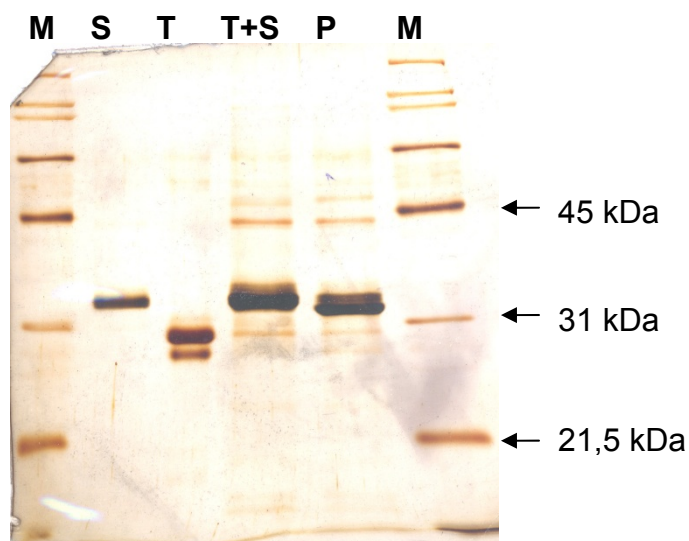
FT = prošlá frakce

W = promytí promývacím pufrem

F1-F5 = eluční frakce 1-5

Poznámka: Při eluci dochází k výraznému zahuštění vzorku oproti nánosu.

Nejčistší eluční frakce (F5) byla renaturována a dialýzou převedena do pufru vhodného pro štěpení TEV proteázou (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH 8.0). Reakční směs byla inkubována přes noc ve 4°C. Průběh štěpení byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz Obrázek 19).



Obrázek 19: SDS-PAGE analýza vzorků ze štěpení TEV proteázou.

M = standard molekulárních hmotností S = štěpený vzorek

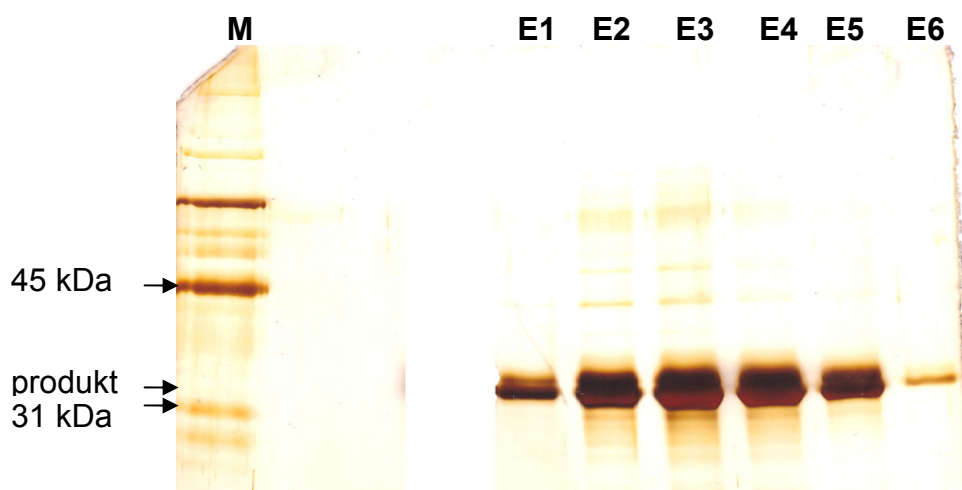
T = TEV proteáza

T+S = reakční směs v čase t_0

P = reakční směs po proběhnuvším štěpení

Odštěpený fragment má molekulární hmotnost 3,1 kDa (ExPASy). Štěpený produkt má tedy molekulární hmotnost 29,2 kDa. Ze srovnání pohyblivosti v drahách T+S a P je posun ve velikosti produktu odpovídající tomuto zkrácení dobře patrný.

Štěpený vzorek byl poté dialýzou převeden do nanášecího pufru a opět purifikován pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči (výsledky neuvedeny), kde byla tentokrát jímána prošlá frakce, protože jak TEV proteáza tak případný neštěpený produkt obsahují His kotvu. Průběh chelatační chromatografie byl analyzován SDS-PAGE analýzou vzorků odebraných z jednotlivých frakcí (výsledky neuvedeny). Prošlá frakce byla finálně purifikována pomocí ionexové chromatografie na nosiči DEAE Sepharose Fast Flow. Eluce byla prováděna gradientem chloridu sodného a jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Tímto postupem byl získán čistý produkt (frakce E5 a E6, viz Obrázek 20) použitý dále pro tvorbu polyklonální protilátky α hPrp31 a charakterizaci produktu.



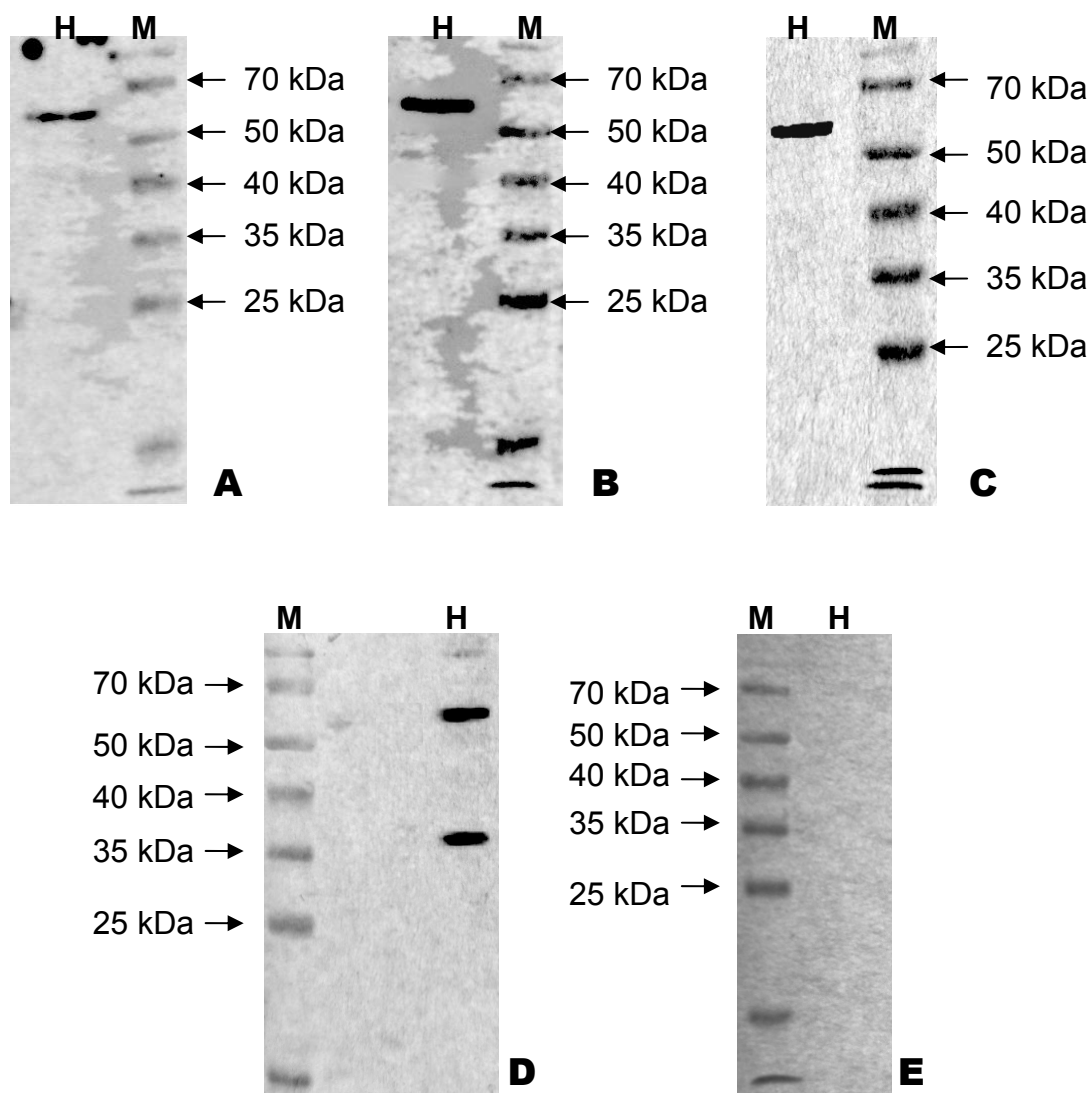
Obrázek 20: SDS-PAGE analýza elučních frakcí ionexové chromatografie.

M = standard molekulárních hmotností E1-E6 = eluční frakce 1-6

Příprava polyklonální králičí protilátky α hPrp31

Vyčištěný protein byl použit k přípravě polyklonální králičí protilátky. Před imunizací byla pomocí WB analýzy otestována séra tří králíků ředěná 1:500 a 1:1000 jako primární protilátka na vzorcích lyzátu HeLa buněk a čistého produktu, aby se vyloučila zvířata s případnou autoreaktivitou proti hPrp31 proteinu. Nebyla zjištěna vazba protilátek séra ani jednoho z testovaných králíků na čistý produkt. Byly pozorovány poměrně četné vazby protilátek sér testovaných králíků na proteiny HeLa lyzátů. Tato vlastnost nebyla uniformní, a tak byl pro další postup vybrán králík č. 3, jehož přirozené protilátky reagovaly s proteiny HeLa lyzátů nejméně (výsledky neuvedeny).

Tento králík byl postupně třikrát imunizován čistým produktem ve směsi 1:1 s Freudovým adjuvans a vždy týden po imunizaci byla tvorba α hPrp31 protilátek testována pomocí WB na vzorcích lyzátu HeLa buněk. Z Obrázku 21 je patrné, že již po první imunizaci reagují protilátky králičího séra s proteinem o stejné hmotnosti jako kontrolní α hPrp31 protilátka odpovídající endogennímu hPrp31 (55.5 kDa). Po třetí imunizaci již nedošlo k zvýšení reaktivity α hPrp31 protilátek, a tak bylo odebráno celé sérum.



Obrázek 21: WB analýza králičího séra v průběhu imunizace pomocí purifikovaného produktu.

A = po první imunizaci

B = po druhé imunizaci

C = po třetí imunizaci

D = pozitivní kontrola

E = negativní kontrola

Vzorky:

H = lyzát HeLa buněk

M = standard molekulárních hmotností

Primární protilátky:

A – C: králičí sérum získané týden po příslušné imunizaci ředěné

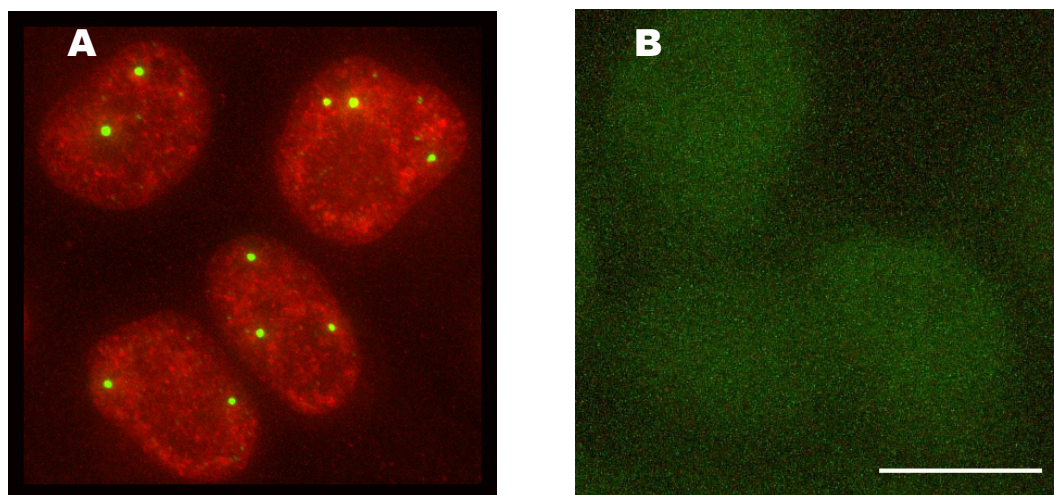
D: králičí protilátka α hPrp31 poskytnutá Dr. C. Rivoltou [108]

E: jen sekundární protilátka

Sekundární protilátka:

A – E: kozi α králičí konjugovaná s křenovou peroxidázou

Dále byla ověřena použitelnost připravené protilátky pro imunofluorescenční značení proteinu hPrp31 v HeLa buňkách (viz Obrázek 22). Protilátka rozpoznávala protein v buněčném jádře, specificky v jaderných skvrnách, kde se akumulují nepoužívané sestřihové faktory. Nicméně připravená protilátka nereagovala s hPrp31 proteinem akumulovaným v Cajalových tělíscích, kde se hPrp31 nachází převážně v U4/U6 snRNP komplexu.



Obrázek 22: Výsledek imunofluorescenčního značení připravenou protilátkou.

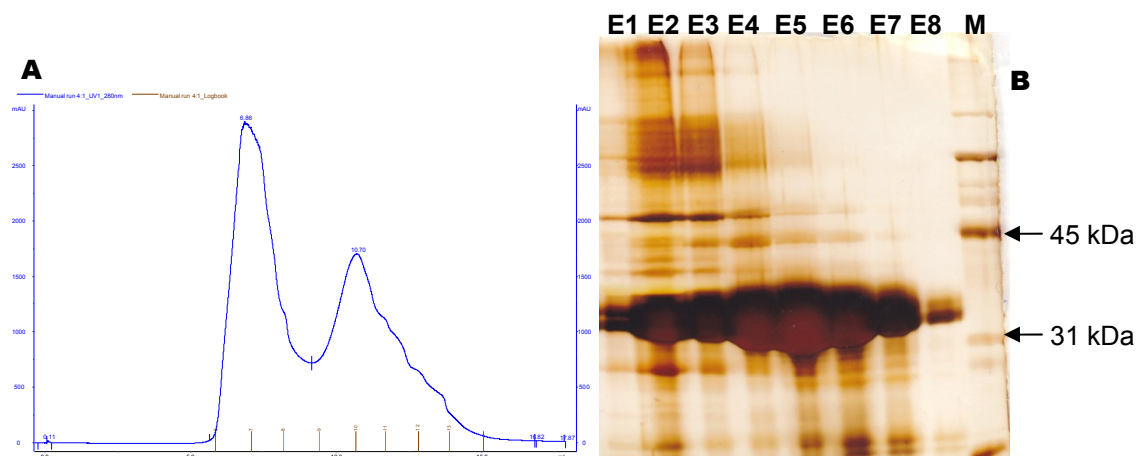
A: červeně – připravená α hPrp31 protilátka, zeleně - coilin, marker Cajalových tělísek

B: kontrola značená jen sekundárními protilátkami

Měřítka: 10 μ m

Charakterizace rekombinantního produktu

Po vytvoření polyklonální králičí protilátky α hPrp31 bylo přistoupeno k biochemické charakterizaci produktu. Při pokusných purifikacích produktu pomocí gelové permeační chromatografie na nosiči Superdex 200 byl pomocí SDS-PAGE analýzy zjištěn jeho vysoký obsah ve všech jímaných frakcích a to i v redukujících podmínkách vázacího pufru (0.05% BME). Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 23.



Obrázek 23: Gelová permeační chromatografie na nosiči Superdex 200

A: Chromatogram gelové permeační chromatografie na nosiči Superdex 200

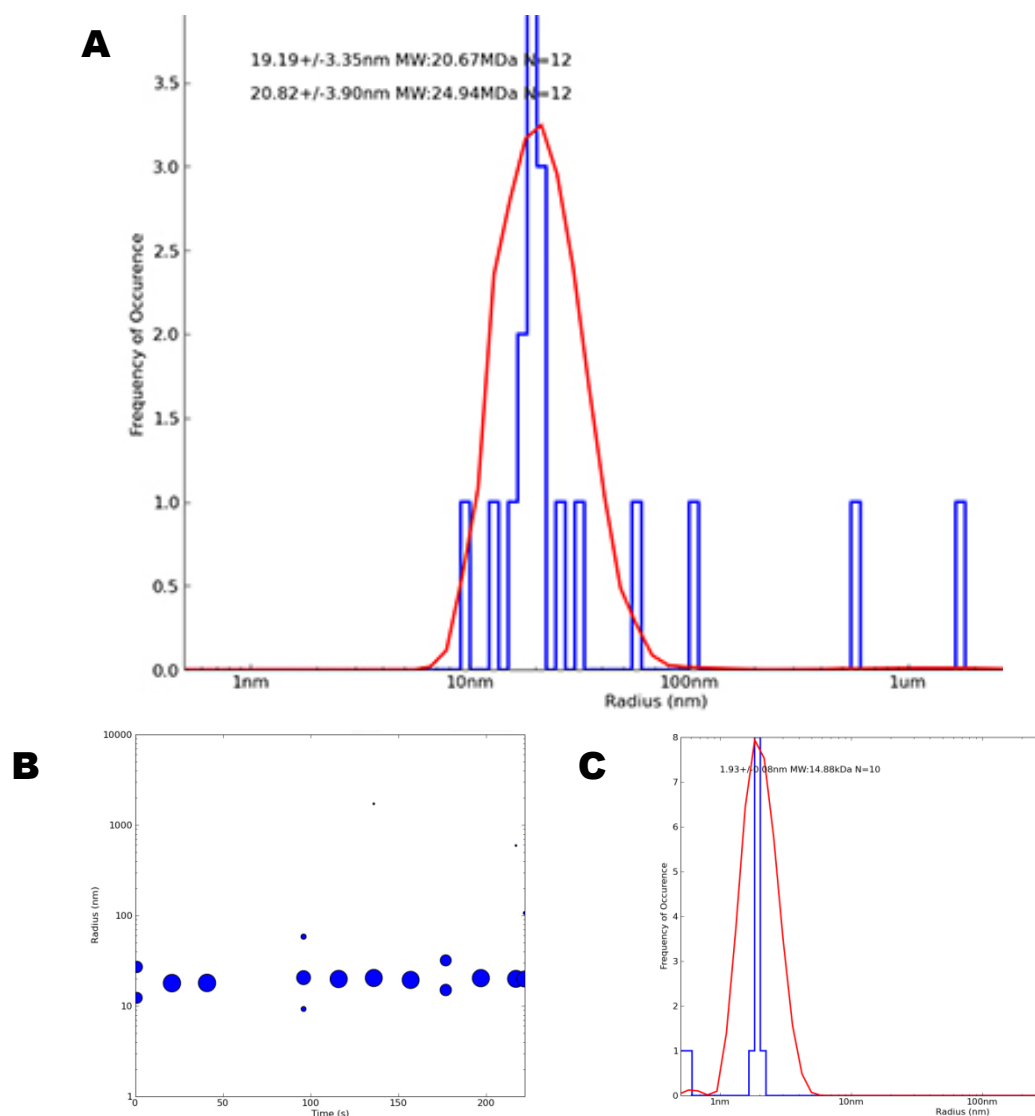
osa x: V [ml]

osa y: UV₂₈₀ [mAU]

B: SDS-PAGE analýza elučních frakcí gelové permeační chromatografie na nosiči Superdex 200.

M = standard molekulárních hmotností E1-E8 = eluční frakce 1-8

Pomocí elučního profilu a kalibrační přímky bylo zjištěno, že první jímaná frakce s vysokým obsahem produktu odpovídala molekulární hmotnosti proteinu cca. 4 MDa. To naznačovalo tvorbu agregátů, která byla dále testována pomocí DLS (dynamic light scattering) u vzorku již purifikovaného produktu.



Obrázek 24: Výsledky DLS vzorku purifikovaného štěpeného produktu proti kontrole.

A: Histogram naměřených výsledků vzorku purifikovaného produktu při 12 měřeních po 20 vteřinách. Výsledek: 20,67 – 24,94 MDa.

osa x: velikost poloměru částic [nm] osa y: četnost naměřeného výsledku

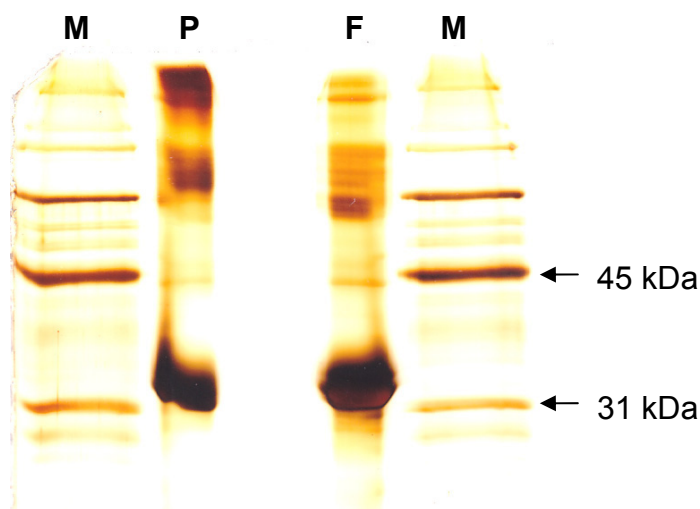
B: Záznam výsledků jednotlivých měření vzorku purifikovaného produktu v čase.

osa x: čas [s] osa y: velikost poloměru částic [nm]

C: Histogram naměřených výsledků pro kontrolu (lysozym 10 mg/ml v 30 mM octanu sodném pH 4,7). Výsledek: 14,88 kDa.

DLS analýza byla provedena celkem u 25 vzorků čistého produktu modifikovaných přidavkem různých detergentů (Triton X-100, Tween 20, dodecyl- β -D-maltosid, octyl-D-glukopyranosid, decyl- β -D-maltosid), dalších redukčních činidel (TCEP, DTT), chaotropního činidla (močoviny) a jejich kombinací. I při 24h inkubaci bylo u všech

vzorků dosaženo stejných nebo velice podobných výsledků jako u výše uvedených na Obrázku 24. Přítomnost vysokomolekulárních agregátů byla dále testována SDS-PAGE analýzou za neredukujících podmínek (viz Obrázek 25).



Obrázek 25: SDS-PAGE analýza vzorků purifikovaného produktu v neredukujícím vzorkovém pufru.

M = standard molekulárních hmotností P = vzorek čistého produktu

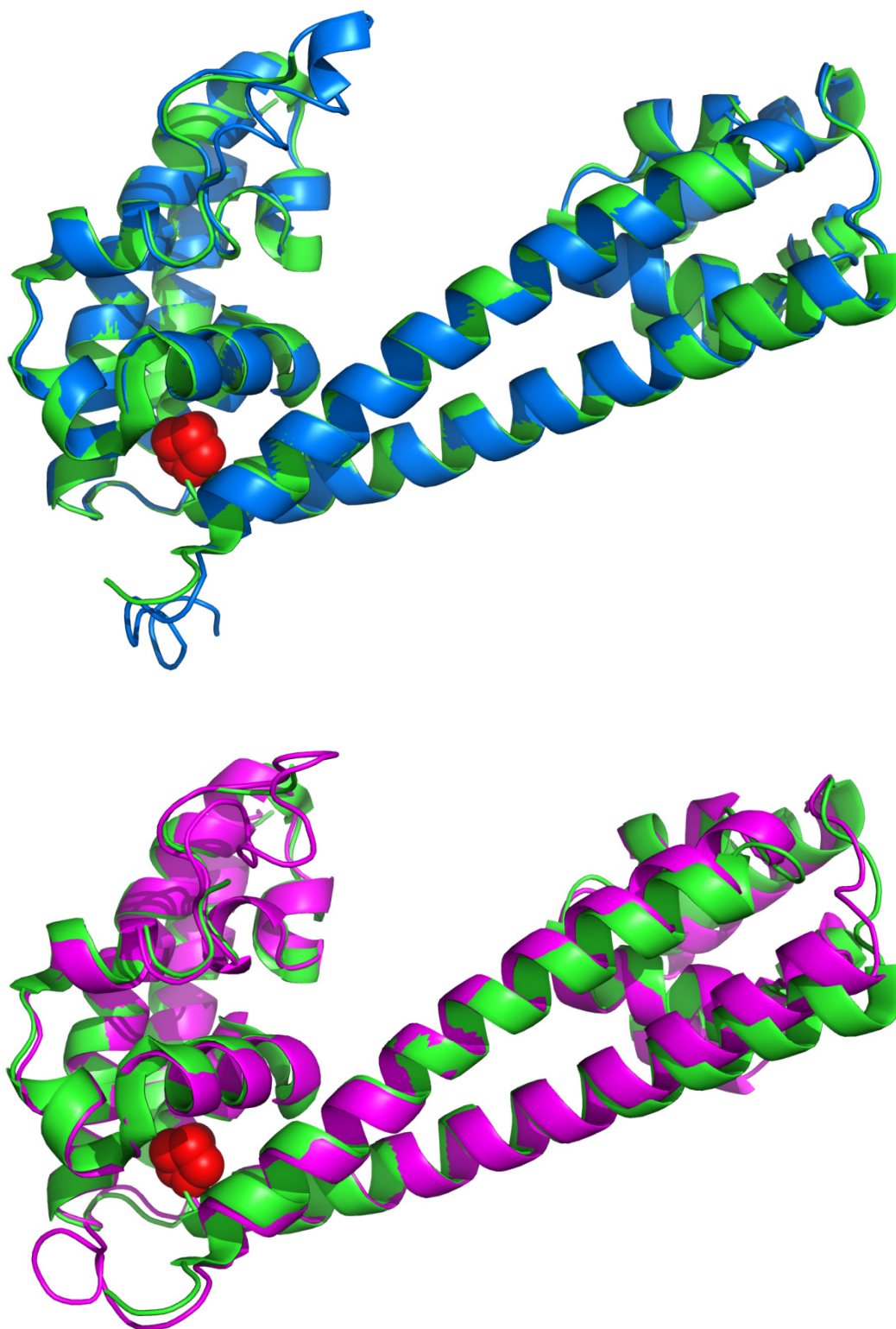
F = vzorek čistého produktu po ultrafiltraci přes membránu s limitem nominální molekulové hmotnosti 50 kDa

U obou vzorků jsou patrné vysokomolekulární příměsi a to i po ultrafiltraci přes membránu s limitem nominální molekulové hmotnosti 50 kDa, i když v menší míře. Z toho lze usuzovat na tvorbu vysokomolekulárních agregátů v roztoku čistého produktu *de novo* i po jejich odfiltrování. Jelikož je součástí produktu Nop doména vázající RNA (spolu s proteinem 15,5K), byl také vyzkoušen hypotetický vliv zbytkové bakteriální RNA ve vzorku na tvorbu vysokomolekulárních agregátů. Vzorek čistého produktu byl převeden do vhodného pufru (30 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0,05% BME, pH 8.5), ve kterém bylo provedeno úplné štěpení nukleových kyselin pomocí enzymu Benzonase[®]. Neredukující SDS-PAGE analýza ukázala, že tento postup nemá vliv na tvorbu vysokomolekulárních agregátů ve vzorku produktu a RNA eventuálně navázaná na produkt zřejmě nehraje roli v jejich nukleaci (výsledky analogické s těmi zobrazenými na Obrázku 25, nejsou uvedeny).

Homologní modelování

Po zjištění, že produkt vytváří vysokomolekulární agregáty a nelze tedy přistoupit k testování krystalizačních podmínek bylo rozhodnuto vytvořit pro potřeby strukturní analýzy AD29 mutace proteinu hPrp31 strukturní model za pomoci homologního modelování (viz Obrázek 26). K němu byl využit alignment se stejným úsekem wild-type proteinu hPrp31, jehož strukturní model byl vyřešen pomocí rentgenové krystalografie. K tvorbě modelu byl použit program I-TASSER [117]. Tento program je hodnocen jako jeden z nejspolehlivějších nástrojů pro predikci terciární struktury proteinů, který v letech 2006 a 2008 zvítězil v experimentech CASP7 a CASP8 (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) [118].

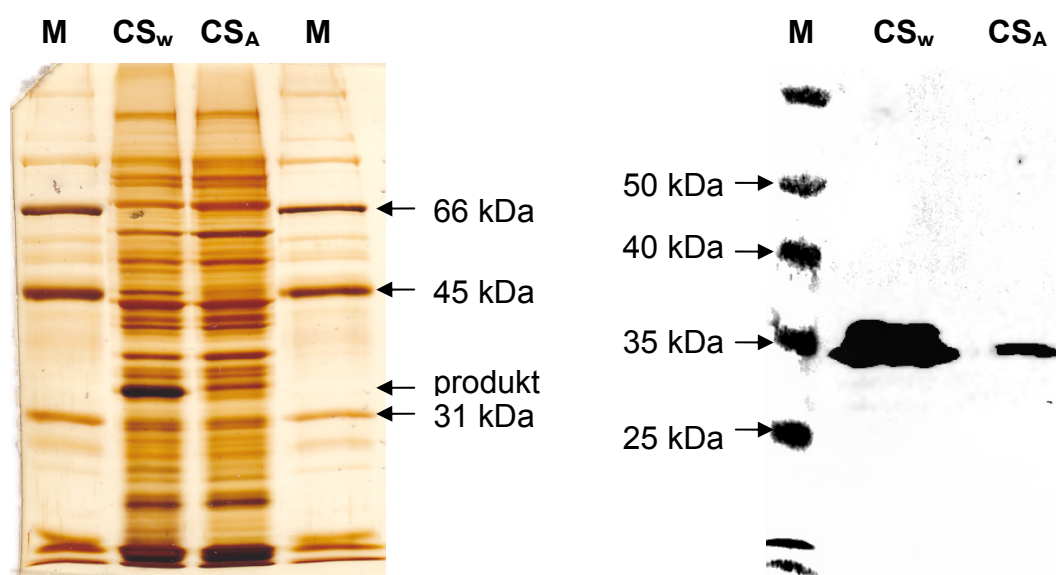
Z modelů struktury úseku 78-333 AD29 mutantní formy proteinu hPrp31 vyplývá, že tato mutace podle očekávání pravděpodobně neovlivňuje přímo vazebné domény (Nop a Coiled-coil, viz Obrázek 8), ale jejich vzájemnou orientaci, což může být příčinou efektů této mutace. Je otázkou do jaké míry se reálně u AD29 mutace uplatňuje cis-trans izomerie prolinů 216 a 217, která by mohla mít dramatičtější vliv na volnou smyčku spojující vazebné domény Nop a Coiled-coil a tím i na jejich vzájemnou orientaci než ukazují tyto modely.



Obrázek26: Srovnání wild-type struktury úseku 78-333 proteinu hPrp31 (zeleně) se dvěma strukturami AD29 mutantní formy (modře a růžově) modelovanými pomocí programu I-TASSER, které dosáhly nejvyššího C skóre (kvantifikace míry kvality modelu). Místo mutace je zvýrazněno červeně.

Exprese wild-type hPrp31 (78-333)

Po zjištění, že AD29 mutantní forma proteinu hPrp31 vytváří vysokomolekulární agregáty, bylo nutné ověřit, zda se tak děje následkem této mutace, nebo jde o obecnou vlastnost proteinu. Bylo proto přistoupeno k expresi wild-type formy stejného úseku proteinu hPrp31 jako v případě AD29 formy. Postup a výsledky přípravy expresního vektoru byly, až na použitý PCR templát nesoucí cDNA WT hPrp31, totožné (výsledky neuvedeny) a kultivace bakteriálních kultur AD29 a WT proběhla paralelně za stejných podmínek. Ze vzorků biomasy o shodné hmotnosti (3 g) byly odděleny cytosolické frakce. Cytosolické frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a WB (viz Obrázek 27).



Obrázek 27: SDS-PAGE a WB analýza oddělených cytosolických frakcí po paralelní kultivaci bakteriálních kultur produkujících AD29 a WT formu proteinu hPrp31.

M = standard molekulárních hmotností CS_w = cytosolická frakce WT formy

CS_A = cytosolická frakce AD29 formy

WB analýza s použitím protilátek: primární myší α V5, sekundární králičí α myší konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Z výsledků jasně vyplývá, že zatímco AD29 mutantní forma je v souladu s předchozími výsledky v cytosolické frakci zastoupena velmi málo, u wild-type formy tomu tak není. Wild-type forma je bohatě zastoupena v rozpustné formě v cytosolické frakci. Nízkou rozpustnost mutantní formy a tvorbu vysokomolekulárních agregátů tak lze přičítat mutaci Ala216Pro.

Diskuse

Pochopení role sestřihových faktorů v dědičném onemocnění retinitis pigmentosa je nezbytným předpokladem nejen k případné budoucí léčbě, ale i k lepšímu porozumění přirozených funkcí těchto proteinů v pre-mRNA sestřihu. Největší výzvou na tomto poli zůstává zodpovězení otázky, jak je možné, že mutantní formy těchto proteinů, bez nichž se neobejde žádná transkripčně aktivní buňka lidského těla, způsobují nemoc, která postihuje pouze sítnici oka a neohrožuje pacienty na životě. Žádný z dosud navržených modelů cytotoxicity mutací sestřihových faktorů hPrp31, hPrp8, hBrr2 a hPrp3 omezené pouze na buňky fotoreceptorů nelze považovat za definitivně prokázaný.

Existují jisté důkazy podporující model tzv. haploinsuficience, který vychází z předpokladu, že při ztrátě jedné funkční alely daného genu, dochází k nedostatečnosti sestřihu, což vede k postupnému poškozování buněk proteosynteticky náročných fotoreceptorů. Například delece v jedné alele genu PRPF31, které snižují množství tohoto proteinu, způsobují až 2,5% všech případů adRP [62]. Na druhou stranu předpoklad vysokých proteosyntetických nároků coby faktoru odlišujícího fotoreceptory od všech ostatních lidských buněk je jistě diskutabilní. Svou roli může hrát i neobnovitelnost poškozených fotoreceptorů. U člověka končí produkce fotoreceptorů před narozením a k jejich nahrazování pomocí prekurzorových buněk, které dříve popsali někteří autoři, nedochází [119]. Myší model připravený pomocí delece jedné alely genu PRPF31 se nepodařilo připravit, je však nutné vzít v potaz, že myš má coby savec s noční aktivitou daleko vyšší hustotu tyčinek (u kterých se nemoc obvykle projevuje nejdříve) v sítnici a dramaticky změněnou architekturu jejich jader, což může mít na fyziologii sestřihu značný vliv [120].

Uvážíme-li, že u 40% případů adRP není dosud známa žádná konkrétní příčina, nelze vyloučit hypotetickou existenci dosud neobjeveného kofaktoru těchto sestřihových faktorů specifického pro fotoreceptory, který by představoval pravou příčinu vzniku onemocnění. Naopak za vyloučený lze zřejmě považovat model předpokládající zásadní vliv mutantních sestřihových faktorů na sestřih dalších pre-mRNA, který by způsoboval produkci abnormálních proteinů exprimovaných specificky ve fotoreceptorech [87, 110].

K zajímavým souvislostem vede srovnání studií zdůrazňujících roli fyziologických změn odehrávajících se v buňkách sítnice v důsledku změn hladiny kyslíku během

cirkadiálního cyklu s rolí sestřihových faktorů v RP. Na různých myších modelech RP byly pozorovány vlivy oxidačního stresu i hypoxie v procesu programované buněčné smrti fotoreceptorů. Mezi geny, jejichž exprese je regulována v reakci na hypoxický stres, jsou také tři, které kódují komponenty U4/U6•U5 tri-snRNP: PRPF4 kódující protein hPrp4, SART1 kódující protein hSnu66 a LSM8 kódující protein Lsm8 [121]. Protein hPrp4 je vazebným partnerem hPrp3, mutace hPrp3 způsobující RP tuto vazbu oslabuje [88]. Protein hSnu66 je nezbytný pro vazbu U4/U6•U5 tri-snRNP na A komplex, mimo to podstupuje posttranslační modifikaci sumoylací, která může hrát roli v přestavbách spliceosomu během sestřihového cyklu [122, 123]. Protein Lsm8 hraje zásadní roli v recyklaci U4/U6 di-snRNP [53]. Sestřihové faktory, jejichž mutace způsobují RP, všechny zajišťují nutné vazby v rámci U4/U6•U5 tri-snRNP, některé také jejich rozpad s následnou recyklací U4/U6 di-snRNP (hBrr2, hPrp8), nebo vazbu tri-snRNP na A komplex (hPrp3, hPrp31). Souběh poškození některého z nich mutací s odpovědí na změny hladiny kyslíku v sítnici může hrát roli ve vzniku nemoci.

Model získané cytotoxicity předpokládá, že samotný mutantní sestřihový faktor může být pro buňku toxický, například pokud mutace znemožní přirozené skládání proteinu a vede k jeho akumulaci v agregáty jako je tomu u mutace Thr494Met proteinu hPrp31 [89]. Výsledky nasvědčující modelu získané cytotoxicity byly pozorovány i u AD29 mutace proteinu hPrp31. Tvorba mutantního proteinu vedla k snížení životaschopnosti buněk, přestože použitý model exprimoval normální množství endogenního proteinu [115]. Mutace AD29 způsobuje zhoršenou translokaci hPrp31 do jádra, aniž by se nacházela přímo v NLS [113]. Přestože jde o bodovou mutaci vedoucí k záměně alaninu za prolin, která se nachází ve volné smyčce mezi doménami interagujícími s U4 snRNA a proteinem hPrp6 (viz Obrázek 8), protein nesoucí mutaci AD29 neinkorporuje do U4 snRNP komplexu a naopak jeho vazba s hPrp6 je zesílena [114, 115]. Objasnění struktury AD29 mutantní formy a její srovnání se strukturou wild-type formy by jistě pomohlo zodpovědět otázku, jakým způsobem tato mutace ovlivňuje vazebné vlastnosti proteinu hPrp31, respektive jakým způsobem způsobuje vznik onemocnění RP.

Nezbytným předpokladem pro strukturní analýzu rentgenovou krystalografií bylo vytvoření expresního vektoru, optimalizace exprese a purifikace rekombinantního proteinu, který měl být nejprve použit pro tvorbu polyklonální králičí protilátky z důvodu nefunkčnosti komerční α hPrp31 protilátky dodávané firmou Abcam. Kvůli možnosti případného srovnání strukturních modelů AD29 a WT formy bylo rozhodnuto použít stejný úsek mutantního proteinu (aminokyseliny 78-333) jako u autory Liu et al.

publikované struktury WT [105]. Při tvorbě expresního vektoru bylo zjištěno, že Topoizomeráza I kovalentně navázaná na koncích použitého vektoru (pET151/D-TOPO[®]) může zřejmě způsobovat chyby při inkorporaci insertu. V některých klonech byly sekvenční analýzou zjištěny chyby v sekvenci vektoru nacházející se v těsné blízkosti místa inserce. Tento problém vyřešilo použití čerstvého vektoru dodaného výrobcem.

Jelikož u exprimovaného úseku proteinu hPrp31 nejsou známy žádné posttranslační modifikace, byl jako inducibilní heterologní expresní systém použit kmen *E. coli* BL21(DE3). Navzdory snahám o optimalizaci protokolu kultivace bakteriální kultury nebylo u AD29 formy možno dosáhnout zvětšení frakce rozpustného produktu snížením kultivační teploty nebo koncentrace indukčního činidla. Dále byla tedy zpracovávána inkluzní tělíska s vysokým obsahem produktu, která byla čištěna a rozpuštěna v denaturačním pufru. Produkt rozpuštěný v denaturačním pufru byl poté purifikován pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči, renaturován, štěpen TEV proteázou pro odstranění histidinové kotvy a V5 epitopu a poté finálně purifikován pomocí ionexové chromatografie na nosiči DEAE Sepharose Fast Flow.

Získaný čistý produkt byl použit pro přípravu polyklonální králičí protilátky. Sérum imunizovaného králíka se ukázalo jako dobře použitelné pro imunodetekci proteinu hPrp31 při WB. Při imunofluorescenčním značení rozpoznávala připravená protilátka protein v buněčném jádře, specificky v jaderných skvrnách, kde se akumulují nepoužívané sestřihové faktory. Nicméně připravená protilátka nereagovala s proteinem hPrp31 v Cajalových tělískách, kde se hPrp31 nachází převážně v U4/U6 snRNP komplexu. Toto značení bylo pozorováno autory Makarova et al. [54], kteří pro imunizaci použili úsek proteinu hPrp31 mezi aminokyselinami 484-497, který není zahrnut v připraveném konstruktu. Je tedy možné, že po imunizaci úsekem 78-333 aa reaguje protilátka na epitop, který není v komplexu U4/U6 snRNP přístupný.

Při biochemické charakterizaci vyprodukované purifikované AD29 formy proteinu hPrp31 byla zjištěna tvorba vysokomolekulárních agregátů, která byla potvrzena třemi nezávislými metodami (gelovou permeační chromatografií, neredukující SDS-PAGE a DLS). Tvorba agregátů byla potvrzena i po ultrafiltraci vzorku čistého produktu přes membránu s limitem nominální molekulové hmotnosti 50 kDa pro globulární proteiny v redukujících podmínkách, což naznačuje jejich tvorbu *de novo* v roztoku čistého produktu. Pokusy optimalizovat složení pufru s obsahem čistého produktu nevedly k vyřešení tohoto problému. Vzhledem k tomu, že se nejedná o protein s enzymatickou

aktivitou, nebylo možné prostým měřením aktivity ověřit, zda produkt získal po renaturaci nativní konformaci. Nejbližší možné přiblížení, produktivní interakce s vazebnými partnery v rámci U4/U6 di-snRNP, by vyžadovala dostupnost celé řady purifikovaných komponent, což v rozsahu diplomové práce nebylo možné realizovat.

Za této situace nebylo přistoupeno k pokusům o krystalizaci purifikovaného mutantního proteinu, ale k pokusům, které by objasnily, zda je pozorovaná tvorba vysokomolekulárních agregátů následkem mutace AD29. Bylo proto přistoupeno k expresi wild-type formy stejného úseku proteinu hPrp31 jako v případě AD29 formy. Po vytvoření expresního vektoru a ověření správnosti sekvence insertu a jeho okolí byly obě formy exprimovány paralelně v heterologním expresním systému *E. coli* BL21(DE3). Při analýze oddělených cytosolických frakcí ze stejného množství biomasy se ukázalo, že wild-type forma zůstává v daleko větší míře v rozpustné formě v cytosolické frakci a téměř netvoří inkluzní tělíska. Tvorbu vysokomolekulárních agregátů tak lze označit za vlastnost způsobenou mutací AD29, která zřejmě brání zaujmutí nativní konformace proteinu hPrp31 *in vivo*.

K strukturní analýze AD29 formy proteinu hPrp31 byla použita metoda homologního modelování ve srovnání se stejným úsekem WT formy. Výsledek podle očekávání ukázal, že AD29 mutace neovlivňuje přímo vazebné domény proteinu hPrp31, ale jejich vzájemnou orientaci. Je však otázkou do jaké míry se použitý program drží struktury WT formy, která je v tomto případě téměř 100% sekvenčně identická. Pokud bychom vzali v potaz možné uplatnění cis-trans izomerie prolinů 216 a 217, mohl by být rozdíl mezi strukturami WT a AD29 formy daleko dramatičtější než ukazují výsledné modely. Cíle práce se tedy podařilo naplnit, i když strukturní srovnání WT a AD29 formy pomocí homologního modelování nemá zdaleka takovou vypovídací hodnotu, jakou by poskytla strukturní analýza pomocí rentgenové krystalografie. Zjištěná tvorba vysokomolekulárních agregátů u AD29 mutantní formy *in vitro* může mít dalekosáhlé implikace pro její vlastnosti *in vivo*. Tvorba vysokomolekulárních agregátů by vysvětlovala zhoršenou translokaci AD29 hPrp31 do jádra i bez přímého vlivu na NLS, precipitaci vazebného partnera, proteinu hPrp6, i zvýšenou degradaci AD29 formy oproti wild-type hPrp31. Při produkci špatně sbaleného proteinu lze očekávat jeho zvýšenou degradaci komplexem proteazomu. Je otázka, jak efektivně by takový produkt likvidovaly buňky fotoreceptorů, které ve vnějších segmentech odstraňují velké množství nepotřebného materiálu odlučováním membránových disků, které jsou následně odstraňovány buňkami pigmentového epitelu sítnice. Mutace AD29 by tak

mohla kombinovat mechanismus haploinsuficience, protože by skrze tvorbu agregátů bránila přístupu proteinu hPrp31 do jádra, i získané cytotoxicity, protože by koprecipitovala další nezbytnou součást spliceosomu, protein hPrp6, a zároveň tvorbou těchto precipitátů poškozovala buňku.

Seznam použité literatury

1. Weleber R. Retinitis pigmentosa and allied disorders. In: Ryan S, Ogden T, Schachat A, eds. *Retina*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc; 1994:334-40.
2. Hamel, C., *Retinitis pigmentosa*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 40.
3. Haim, M., *Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark*. Acta Ophthalmol Scand Suppl, 2002(233): p. 1-34.
4. *Retinitis pigmentosa. A symposium on terminology and methods of examination*. Ophthalmology, 1983. **90**(2): p. 126-31.
5. Hartong, D.T., E.L. Berson, and T.P. Dryja, *Retinitis pigmentosa*. Lancet, 2006. **368**(9549): p. 1795-809.
6. Boughman, J.A., M. Vernon, and K.A. Shaver, *Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations*. J Chronic Dis, 1983. **36**(8): p. 595-603.
7. Cohen, M.M., W.H. Knobloch, and R.J. Gorlin, *A dominantly inherited syndrome of hyaloideoretinal degeneration, cleft palate and maxillary hypoplasia (Cervenka syndrome)*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1971. **7**(7): p. 83-6.
8. Kolehmainen, J., et al., *Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(6): p. 1359-69.
9. Hims, M.M., S.P. Daiger, and C.F. Inglehearn, *Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects*. Dev Ophthalmol, 2003. **37**: p. 109-25.
10. Daiger, S.P., *Identifying retinal disease genes: how far have we come, how far do we have to go?* Novartis Found Symp, 2004. **255**: p. 17-27; discussion 27-36, 177-8.
11. Dryja, T.P., et al., *Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(10): p. 1972-82.
12. Henderson, R.H., et al., *Biallelic mutation of protocadherin-21 (PCDH21) causes retinal degeneration in humans*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 46-52.

13. Collin, R.W., et al., *Mutations in C2ORF71 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(5): p. 783-8.
14. Daiger SP, Sullivan LS, Bowne S. et al. Retnet, www.sph.uth.tmc.edu/Retnet
15. Berson, E.L., et al., *Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol, 1993. **111**(11): p. 1456-9.
16. Berson, E.L., et al., *Clinical trial of lutein in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A*. Arch Ophthalmol, 2010. **128**(4): p. 403-11.
17. Massof, R.W. and G.A. Fishman, *How strong is the evidence that nutritional supplements slow the progression of retinitis pigmentosa?* Arch Ophthalmol, 2010. **128**(4): p. 493-5.
18. Zhao, X., et al., *Derivation of neurons with functional properties from adult limbal epithelium: implications in autologous cell therapy for photoreceptor degeneration*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 939-49.
19. Lu, B., et al., *Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration*. Exp Eye Res, 2010.
20. Sieving, P.A., et al., *Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3896-901.
21. Ohguro, H., *[New drug therapy for retinal degeneration]*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2008. **112**(1): p. 7-21.
22. Matsuo, T., T. Uchida, and K. Takarabe, *Safety, efficacy, and quality control of a photoelectric dye-based retinal prosthesis (Okayama University-type retinal prosthesis) as a medical device*. J Artif Organs, 2009. **12**(4): p. 213-25.
23. Ohno, M., H. Sakamoto, and Y. Shimura, *Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5187-91.
24. Valadkhan, S., *The spliceosome: a ribozyme at heart?* Biol Chem, 2007. **388**(7): p. 693-7.
25. Jurica, M.S. and M.J. Moore, *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 5-14.
26. Kampa, D., et al., *Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22*. Genome Res, 2004. **14**(3): p. 331-42.

27. Ben-Dov, C., et al., *Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1229-33.
28. Smith, C.W. and J. Valcarcel, *Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 381-8.
29. Lopez-Bigas, N., et al., *Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?* FEBS Lett, 2005. **579**(9): p. 1900-3.
30. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
31. Hertel, K.J., *Combinatorial control of exon recognition*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1211-5.
32. Schellenberg, M.J., D.B. Ritchie, and A.M. Macmillan, *Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(6): p. 243-6.
33. Schneider, M., et al., *Exon definition complexes contain the tri-snRNP and can be directly converted into B-like precatalytic splicing complexes*. Mol Cell, 2010. **38**(2): p. 223-35.
34. Hertel, K.J. and T. Maniatis, *Serine-arginine (SR)-rich splicing factors have an exon-independent function in pre-mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2651-5.
35. Wu, S., et al., *Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35*. Nature, 1999. **402**(6763): p. 832-5.
36. Chu, V.T., et al., *More than one way to splice an RNA: branching without a bulge and splicing without branching in group II introns*. RNA, 1998. **4**(10): p. 1186-202.
37. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *The first ATPase domain of the yeast 246-kDa protein is required for in vivo unwinding of the U4/U6 duplex*. RNA, 1999. **5**(7): p. 959-71.
38. Rino, J. and M. Carmo-Fonseca, *The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus?* Trends Cell Biol, 2009. **19**(8): p. 375-84.
39. Konarska, M.M., J. Vilardeell, and C.C. Query, *Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 543-53.
40. Brow, D.A., *Allosteric cascade of spliceosome activation*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 333-60.

41. Achsel, T., et al., *A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5789-802.
42. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 290-301.
43. Trippe, R., et al., *Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase*. RNA, 2006. **12**(8): p. 1494-504.
44. Askjaer, P., et al., *RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6276-85.
45. Huber, J., et al., *Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure*. EMBO J, 1998. **17**(14): p. 4114-26.
46. Palacios, I., et al., *Nuclear import of U snRNPs requires importin beta*. EMBO J, 1997. **16**(22): p. 6783-92.
47. Jady, B.E., et al., *Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm*. EMBO J, 2003. **22**(8): p. 1878-88.
48. Stanek, D. and K.M. Neugebauer, *Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer*. J Cell Biol, 2004. **166**(7): p. 1015-25.
49. Schaffert, N., et al., *RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3000-9.
50. Stanek, D., et al., *Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2534-43.
51. Chen, C.H., et al., *Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling*. RNA, 2006. **12**(5): p. 765-74.
52. Stanek, D., et al., *Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies*. J Cell Biol, 2003. **160**(4): p. 505-16.
53. Licht, K., et al., *3'-cyclic phosphorylation of U6 snRNA leads to recruitment of recycling factor p110 through LSm proteins*. RNA, 2008.
54. Makarova, O.V., et al., *Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 1148-57.

55. Rino, J., et al., *A stochastic view of spliceosome assembly and recycling in the nucleus*. PLoS Comput Biol, 2007. **3**(10): p. 2019-31.
56. Strzelecka, M., et al., *Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(4): p. 403-9.
57. Walker, M.P., L. Tian, and A.G. Matera, *Reduced viability, fertility and fecundity in mice lacking the cajal body marker protein, coilin*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6171.
58. Jacobson, S.G., et al., *Phenotypes of stop codon and splice site rhodopsin mutations causing retinitis pigmentosa*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**(5): p. 2521-34.
59. Dry, K.L., et al., *Identification of a 5' splice site mutation in the RPGR gene in a family with X-linked retinitis pigmentosa (RP3)*. Hum Mutat, 1999. **13**(2): p. 141-5.
60. Piriev, N.I., J.M. Shih, and D.B. Farber, *Defective RNA splicing resulting from a mutation in the cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase beta-subunit gene*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(3): p. 463-70.
61. Wang, G.S. and T.A. Cooper, *Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(10): p. 749-61.
62. Sullivan, L.S., et al., *Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(7): p. 3052-64.
63. Yu, D.Y. and S.J. Cringle, *Retinal degeneration and local oxygen metabolism*. Exp Eye Res, 2005. **80**(6): p. 745-51.
64. Wangsa-Wirawan, N.D. and R.A. Linsenmeier, *Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(4): p. 547-57.
65. Sancho-Pelluz, J., et al., *Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration*. Mol Neurobiol, 2008. **38**(3): p. 253-69.
66. de Gooyer, T.E., et al., *Rod photoreceptor loss in Rho^{-/-} mice reduces retinal hypoxia and hypoxia-regulated gene expression*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(12): p. 5553-60.
67. Usui, S., et al., *Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa*. Mol Ther, 2009. **17**(5): p. 778-86.

68. Graziotto, J.J., et al., *Decreased Levels of the RNA Splicing Factor Prpf3 in Mice and Zebrafish Do Not Cause Photoreceptor Degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008.
69. Bujakowska, K., et al., *Study of gene-targeted mouse models of splicing factor gene Prpf31 implicated in human autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP)*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(12): p. 5927-33.
70. Keen, T.J., et al., *Mutations in a protein target of the Pim-1 kinase associated with the RP9 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(4): p. 245-9.
71. Maita, H., et al., *Association of PAP-I and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex*. Exp Cell Res, 2005. **302**(1): p. 61-8.
72. Maita, H., et al., *PAP-I, the mutated gene underlying the RP9 form of dominant retinitis pigmentosa, is a splicing factor*. Exp Cell Res, 2004. **300**(2): p. 283-96.
73. Shirogane, T., et al., *Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 709-19.
74. Miyako, K., et al., *PAPA-I Is a nuclear binding partner of IGFBP-2 and modulates its growth-promoting actions*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(2): p. 169-75.
75. Xu, S.Y., et al., *A ninth locus (RP18) for autosomal dominant retinitis pigmentosa maps in the pericentromeric region of chromosome 1*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(8): p. 1193-7.
76. Horowitz, D.S., R. Kobayashi, and A.R. Krainer, *A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs*. RNA, 1997. **3**(12): p. 1374-87.
77. Liu, S., et al., *The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1418-30.
78. Makarov, E.M., et al., *Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2205-8.
79. Wahl, M.C., C.L. Will, and R. Luhrmann, *The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine*. Cell, 2009. **136**(4): p. 701-18.
80. Song, E.J., et al., *The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome*. Genes Dev, 2010. **24**(13): p. 1434-47.

81. Boehringer, D., et al., *Three-dimensional structure of a pre-catalytic human spliceosomal complex B*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(5): p. 463-8.
82. Nottrott, S., H. Urlaub, and R. Luhrmann, *Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins*. EMBO J, 2002. **21**(20): p. 5527-38.
83. Little, J.T. and M.S. Jurica, *Splicing factor SPF30 bridges an interaction between the prespliceosome protein U2AF35 and tri-small nuclear ribonucleoprotein protein hPrp3*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8145-52.
84. Lehnert, S., et al., *Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p*. Oncogene, 2008. **27**(17): p. 2390-400.
85. Wang, A., et al., *Identification and characterization of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(12): p. 2117-26.
86. Chakarova, C.F., et al., *Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(1): p. 87-92.
87. Gamundi, M.J., et al., *Transcriptional expression of cis-acting and trans-acting splicing mutations cause autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Hum Mutat, 2008. **29**(6): p. 869-78.
88. Gonzalez-Santos, J.M., et al., *Mutation in the splicing factor Hprp3p linked to retinitis pigmentosa impairs interactions within the U4/U6 snRNP complex*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(2): p. 225-39.
89. Comitato, A., et al., *Mutations in splicing factor PRPF3, causing retinal degeneration, form detrimental aggregates in photoreceptor cells*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(14): p. 1699-707.
90. Greenberg, J., et al., *A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on the short arm of chromosome 17*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(6): p. 915-8.
91. Siatecka, M., J.L. Reyes, and M.M. Konarska, *Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1983-93.
92. Grainger, R.J. and J.D. Beggs, *Prp8 protein: at the heart of the spliceosome*. RNA, 2005. **11**(5): p. 533-57.

93. Pena, V., et al., *Structure of a multipartite protein-protein interaction domain in splicing factor prp8 and its link to retinitis pigmentosa*. Mol Cell, 2007. **25**(4): p. 615-24.
94. Towns, K.V., et al., *Prognosis for splicing factor PRPF8 retinitis pigmentosa, novel mutations and correlation between human and yeast phenotypes*. Hum Mutat, 2010. **31**(5): p. E1361-76.
95. Maeder, C., A.K. Kutach, and C. Guthrie, *ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(1): p. 42-8.
96. Boon, K.L., et al., *prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 1077-83.
97. Zhao, C., et al., *Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in SNRNP200, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(5): p. 617-27.
98. Achsel, T., et al., *The human U5-220kD protein (hPrp8) forms a stable RNA-free complex with several U5-specific proteins, including an RNA unwindase, a homologue of ribosomal elongation factor EF-2, and a novel WD-40 protein*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6756-66.
99. Small, E.C., et al., *The EF-G-like GTPase Snul14p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DExD/H box ATPase*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 389-99.
100. Fabrizio, P., et al., *The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome*. Mol Cell, 2009. **36**(4): p. 593-608.
101. Hahn, D. and J.D. Beggs, *Brr2p RNA helicase with a split personality: insights into structure and function*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 1105-9.
102. Vithana, E.N., et al., *A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11)*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 375-81.
103. Weidenhammer, E.M., M. Ruiz-Noriega, and J.L. Woolford, Jr., *Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3580-8.

104. Schneider, M., et al., *Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(2): p. 216-21.
105. Liu, S., et al., *Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP*. Science, 2007. **316**(5821): p. 115-20.
106. Mordes, D., et al., *Identification of photoreceptor genes affected by PRPF31 mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Neurobiol Dis, 2007. **26**(2): p. 291-300.
107. Yuan, L., et al., *Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells*. J Neurosci, 2005. **25**(3): p. 748-57.
108. Rio Frio, T., et al., *Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1519-31.
109. Kohn, L., et al., *Breakpoint characterization of a novel approximately 59 kb genomic deletion on 19q13.42 in autosomal-dominant retinitis pigmentosa with incomplete penetrance*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(5): p. 651-5.
110. Rivolta, C., et al., *Variation in retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations*. Hum Mutat, 2006. **27**(7): p. 644-53.
111. Rio Frio, T., et al., *Two trans-acting eQTLs modulate the penetrance of PRPF31 mutations*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(20): p. 3154-65.
112. Deery, E.C., et al., *Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(25): p. 3209-19.
113. Wilkie, S.E., et al., *A study of the nuclear trafficking of the splicing factor protein PRPF31 linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP)*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(3): p. 304-11.
114. Wilkie, S.E., et al., *Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by missense mutations in the splicing factor gene PRPF31*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 683-90.
115. Huranova, M., et al., *A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(11): p. 2014-23.

116. Tanackovic, G. and C. Rivolta, *PRPF31 alternative splicing and expression in human retina*. Ophthalmic Genet, 2009. **30**(2): p. 76-83.
117. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang, *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nat Protoc, 2010. **5**(4): p. 725-38.
118. Zhang, Y., *I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2009. **77**: p. 100-113.
119. Gualdoni, S., et al., *Adult ciliary epithelial cells, previously identified as retinal stem cells with potential for retinal repair, fail to differentiate into new rod photoreceptors*. Stem Cells, 2010. **28**(6): p. 1048-59.
120. Solovei, I., et al., *Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution*. Cell, 2009. **137**(2): p. 356-68.
121. Schmidt-Kastner, R., et al., *Hypoxia-regulated components of the U4/U6.U5 tri-small nuclear riboprotein complex: possible role in autosomal dominant retinitis pigmentosa*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 125-35.
122. Makarova, O.V., E.M. Makarov, and R. Luhrmann, *The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2553-63.
123. Schimmel, J., et al., *Positively charged amino acids flanking a sumoylation consensus tetramer on the 110kDa tri-snRNP component SART1 enhance sumoylation efficiency*. J Proteomics, 2010. **73**(8): p. 1523-34.

Seznam zkratek

aa	aminokyselina/y (amino acid)
AD29	označení mutace proteinu hPrp31 Ala216Pro (resp. G646C v genu PRPF31)
adRP	autozomálně dominantní retinitis pigmentosa
arRP	autozomálně recesivní retinitis pigmentosa
BBP	protein vázající BPS
BME	2-merkapt ethanol
BPS	sekvence větvičího bodu
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DEAE	diethylaminoethyl
DLS	dynamic light scattering
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DOC	deoxycholát sodný
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ERG	elektroretinografie
ETG	ethyl- β -D-thiogalaktosid
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FPLC	druh kapalinové chromatografie (Fast protein liquid chromatography)
HGMD	databáze Human Gene Mutation Data
His ₆	histidinový hexapeptid
hnRNP	heterogenní jaderný ribonukleoprotein
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
LB	Luria-Bertani (typ média)
MIM ID	identifikační číslo v databázi Online Mendelian Inheritance in Man
Ni-CAM HC	nosič pro chelatační chromatografii (Nickel Chelate Affinity Matrix, High Capacity)

NLS	signální sekvence pro transport do jádra
NMD	nonsense-mediated decay, degradační dráha mRNA
OD ₅₅₀	absorbance při vlnové délce 550 nm
PBS	fyziologický roztok pufovaný fosfátem (Phosphate Buffered Saline)
PBS-T	1x PBS, 0,05% Tween
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RP	retinitis pigmentosa
RPE	pigmentový epitel sítnice (retinal pigmented epithelium)
RPM	otáčky za minutu (rounds per minute)
RSB	redukující vzorkový pufr
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
snRNP	malý jaderný ribonukleoprotein (small nuclear ribonucleoprotein)
TAE	roztok obsahující Tris, acetát a EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát
UniProt	databáze Universal Protein Resource
UV ₂₈₀	absorbance při vlnové délce 280 nm
v/v	objemová procenta
WB	příčný elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (Western Blot)
WT	přirozená forma (wild-type)
xRP	x vázaná RP
YFP	žlutě fluoreskující protein (yellow fluorescent protein)

Evidence vypůjčovatелů

Souhlasím se zapůjčením této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatелů. Převzaté údaje je vypůjčovatел povinen řádně citovat.

jméno, příjmení, adresa	datum vypůjčení	poznámka